

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

CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA INFECÇÃO PELO  
VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA

MILENE SCHMITZ

PORTO ALEGRE

2006

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

CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA INFECÇÃO PELO  
VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA

MILENE SCHMITZ

Dissertação apresentada como  
requisito para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Veterinárias na  
área de concentração em Patologia  
Veterinária, da Universidade  
Federal do Rio grande do Sul (RS).  
Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE

2005

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela saúde e força. Aos meus Pais (Delano e Henriete) e irmãs (Caroline, Cássia e Maíra) que acreditaram e apoiaram meu trabalho e dedicação com intensidade.

Ao prof. orientador David Driemeier pela orientação, amizade, exemplo e confiança. Aos amigos Sandra e Edson pela ajuda, conselhos e exemplo de amor à patologia. Ao Luis Gustavo (Titi) e Caroline (Carol) pela ajuda na elaboração da técnica de Imunoistoquímica e pela amizade. Aos meus queridos colegas e amigos Anderson (Ander), André (Dé), Daniela (Dani) e Priscila (Pri) pela ajuda e apoio. As gurias do laboratório (Mahili e Angelai) pelas “orelhas” cortadas, pela amizade e amor compartilhados e pelos papos e cafezinhos para descontrair, e nesse quesito entram também meus queridos amigos. Aos estagiários, pela ajuda para elaboração desse trabalho.

A todos um muito obrigado, espero que em minha caminhada eu sempre encontre pessoas como vocês que fazem com que o dia a dia se torne mais fácil, prazeroso e produtivo.

Obrigada.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
RESUMO .....	9
<i>ABSTRACT</i> .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 Agente etiológico.....	13
2.2 Epidemiologia.....	14
2.3 Patogenia. ....	16
2.3.1 Infecção pós-natal primária .....	16
2.3.2 Infecção intra-uterina.....	17
2.3.3 Imunodepressão .....	21
2.4 Sinais Clínicos .....	22
2.4.1 Infecção pós-natal primária .....	23
2.4.2 Infecção uterina (congênita) .....	24
2.4.3 Doença das mucosas (DM).....	25
2.5 Patologia .....	26
2.5.1 Infecção primária após nascimento .....	26
2.5.2 Infecção uterina (congênita) .....	27
2.5.3 Infecção persistente .....	28
2.5.4 Doença das mucosas .....	29
2.6 Diagnóstico.....	32
2.6.1 Isolamento viral .....	32
2.6.2. Detecção do antígeno.....	33
2.6.3 Detecção dos ácidos nucleicos .....	34
2.6.4 Sorologia.....	35
2.7 Diagnóstico diferencial.....	36

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Procedimentos gerais.....	37
3.2 Análise post mortem.....	37
3.3 Análise histológica .....	38
3.4 Imunoistoquímica (IHQ) .....	38
3.5 Isolamento viral.....	39
4. RESULTADOS .....	40
4.1 Procedimentos gerais.....	40
4.2 Sinais clínicos .....	41
4.3 Achados de necropsia .....	43
4.4 Histologia .....	46
4.5 Fetos bovinos.....	47
4.6 Imunoistoquímica .....	48
4.7 Isolamento viral.....	53
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bovinos avaliados de 1996 a 2003. Raça, idade, sexo, suspeita clínica e sinais clínicos.....	40
Tabela 2. Casos positivos para infecção pelo vírus da diarreia viral bovina. Raça, ano que ocorreu o caso, idade, sexo e sinais clínicos.....	41
Tabela 3. Achados macroscópicos observados nos bovinos com BVDV.....	43
Tabela 4. Distribuição do antígeno do BVDV nos tecidos de seis bovinos com BVDV.....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. BVDV. Sinais clínicos. Bovino 5. Diarréia crônica sanguinolenta. ....	42
Figura 2. BVDV. Sinais clínicos. Bovino 6. Diarréia aquosa em arco. Subdesenvolvimento. .....	42
Figura 3. BVDV. Sinais clínicos. Bovino 3. Lesões crostosas na narina.....	42
Figura 4. BVDV. Bovino 3. Ulceração focal na base da língua.....	44
Figura 5. BVDV. Bovino 3. Omaso. Área de erosão na mucosa. ....	44
Figura 6. BVDV. Bovino 5. Intestino grosso. Fissuras multifocais na mucosa intestinal. ...	44
Figura 7. BVDV. Bovino 5. Intestino delgado. Presença de exsudato fibrinonecrótico aderido às placas de Peyer.....	45
Figura 8. BVDV. Bovino 6. Intestino delgado. Evidenciação da placa de Peyer. ....	45
Figura 9. BVDV. Bovino 3. Membro posterior direito com pododermatite. Fissuras na banda coronária (seta). ....	45
Figura 10. BVDV. Bovino 5. Intestino delgado. Enterite mista difusa acentuada com depósitos de fibrina na mucosa. Necrose de epitélio de cripta. HE, obj. 10 .....	46
Figura 11. BVDV. Feto bovino. Cérebro. Cavidade cística na substância branca (Seta) (Porencefalia).....	47
Figura 12. BVDV. Bovino 6. Tecido cutâneo (orelha). Marcação positiva (vermelha) nas células epiteliais dos folículos pilosos e células endoteliais. IHQ, obj. 40 .....	48
Figura 13. BVDV. Bovino 2. Cérebro. Córtex cerebral. Marcação positiva acentuada no citoplasma de neurônios (A). Controle negativo (B). IHQ, obj. 40 .....	50
Figura 14. BVDV. Bovino 3. Cérebro. Córtex cerebral. Marcação positiva (vermelha) acentuada difusa no citoplasma de neurônios (células piramidais) (A). Controle negativo (B). IHQ, obj. 20.....	50
Figura 15. BVDV. Bovino 1. Cerebelo. Marcação positiva multifocal moderada no citoplasma de neurônios da camada granular e das células de Purkinje (A). Controle negativo (B). IHQ, obj.10.....	50

Figura 16. BVDV. Bovino 1. Intestino delgado. Marcação positiva vermelha no ápice de enterócitos das criptas intestinais e nas células mononucleares da lâmina própria. IHQ, obj. 100 .....	51
Figura 17. BVDV. Bovino 2. Rim. Marcação positiva multifocal acentuada nos túbulos medulares retos da zona medular (A). Controle negativo (B). IHQ, obj. 20.....	51
Figura 18. BVDV. Feto bovino. Córtex cerebral. Marcação positiva para BVDV nas células endoteliais (setas). IHQ, obj. 40 .....	52
Figura 19. BVDV. Feto bovino. Timo. Marcação positiva acentuada para BVDV. IHQ, obj. 10 .....	52



## RESUMO

Foram testadas na imunistoquímica (IHQ) para diarreia viral bovina (BVDV) 654 biópsias de tecidos cutâneos da orelha de bovinos e tecidos de 161 fetos bovinos abortados. Concomitantemente, foram avaliados pela necropsia, histologia e IHQ 19 casos ocorridos entre janeiro de 1996 e dezembro de 2003 e dois casos acompanhados entre janeiro de 2004 e agosto de 2005, remetidos ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No total, duas biópsias, seis bovinos e três fetos bovinos abortados apresentaram antígenos do BVDV na IHQ. As lesões macroscópicas desses animais ocorreram principalmente no trato digestivo, como enterite e ulcerações na cavidade oral, gengiva e língua. Atrofia de timo e linfadenomegalia também foram observadas. Histologicamente, hiperplasia linfóide e perda da estrutura folicular nos linfonodos, necrose das placas de Peyer, gliose e neuronofagia (cérebro) e nefrite e degeneração tubular renal foram algumas das lesões observadas. Na IHQ a marcação positiva do antígeno viral foi evidenciada principalmente na pele, cérebro, cerebelo, intestino delgado, linfonodos e baço. A prevalência de casos de BVDV em bovinos representou 23,8% do total de 21 bovinos suspeitos necropsiados entre janeiro de 1996 a agosto de 2005 e 1,86% dos fetos abortados examinados entre junho 1999 e maio 2004 no SPV-UFRGS.

## **ABSTRACT**

*Six hundred and fifty four fragments of bovine ears and 161 fragments of tissues from bovine aborted fetuses submitted to diagnosis were examined through an immunohistochemistry (IHQ) test for bovine viral diarrhea virus (BVDV) antigen. The tissues from 19 bovines with clinical BVD submitted to the Department of Veterinary Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, between January 1996 and December 2003, and two bovine submitted between January 2004 and August 2005, were examined through routine necropsy, histology and BVDV-IHQ. Tissues from six bovine and those from three aborted fetuses were positive in the BVDV-IHQ test. The main gross lesions included ulcers in the oral cavity, gums, and tongue, enteritis, thymus atrophy, and enlarged lymph nodes. Histological findings were lymphoid hyperplasia and follicular obliteration of nodal architecture, necrosis of Peyer's patches of the intestine, gliosis and neuronophagia in the brain, and nephritis with tubular degeneration. Skin, brain, cerebellum, small intestine, lymph nodes and/or spleen sections from six BVDV infected cattle and three aborted fetuses showed were positive in the BVDV-IHQ test. In this study, 23,80% of bovine submitted to necropsy between January 1996 and August 2005, and 1,86% of bovine aborted fetuses were BVDV infected.*

## INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é classificado na família *Flaviviridae* e é membro do gênero *Pestivirus*. Três espécies de pestivirus são reconhecidas, o BVDV, a doença da fronteira (*border disease*) e peste suína clássica (BAKER, 1987; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004).

Tradicionalmente, as manifestações da infecção pelo BVDV são apresentadas em três categorias: infecção pós-natal ou BVD, infecção fetal e doença das mucosas (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004).

O BVDV é altamente infeccioso (LONERAGAN et al, 2005). A prevalência da infecção nos rebanhos é alta e nos bovinos acima de um ano de idade 60 a 80% possuem anticorpos neutralizantes séricos para o BVDV. Entretanto, a incidência da doença das mucosas é baixa.

Os bovinos se infectam de duas maneiras, pela infecção pós-natal de bovinos que não tiveram exposição prévia ao vírus e pela infecção fetal durante a gestação. Quando a infecção fetal ocorre entre os 90 e 120 dias produzirá imunotolerância ao BVDV e o bovino nasce persistentemente infectado (PI). Esse animal desenvolve a doença das mucosas e é fonte de infecção mais importante em um rebanho (HOUE, 1995; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004).

A manifestação clínica após a infecção pelo BVDV é dependente de múltiplos fatores: agente, hospedeiro e ambiente. Entre os fatores do hospedeiro estão a imunocompetência e a imunotolerância ao BVDV, estado imune (passivo pelos anticorpos colostrais ou ativo pela exposição ao BVDV ou vacinação), gestação nas fêmeas, idade gestacional do feto no momento da infecção, nível de estresse ambiental no momento da infecção e concorrência com outros patógenos (RADOSTITS et al, 2002; BOLIN & GROOMS, 2004).

O BVDV tem sido associado com patologia em inúmeros sistemas incluindo o respiratório, hematológico, imunológico, neurológico e reprodutivo (GROOMS, 2004). Os achados patológicos variam de acordo com o curso e evolução da doença (RADOSTITS et al, 2002). As lesões são resultados da interação de fatores como o biotipo do vírus, o genótipo hospedeiro, idade, estado imune do animal no momento da infecção, da resposta imune induzida, e infecções intercorrentes ou outros fatores estressantes (BIELEFELDT-OHMANN, 1995).

O diagnóstico clínico de doença das mucosas é geralmente feito com base na presença de achados clínicos e patológicos característicos (RADOSTITS et al, 2002). Vários são os exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico definitivo, como o isolamento ou detecção de antígenos virais e ou a demonstração da resposta sorológica ao vírus (RADOSTITS et al, 2002; SALIKI & DUBOVI, 2004).

A técnica de imunoistoquímica (IHQ) possui algumas vantagens frente às demais técnicas, como a estabilidade das amostras fixadas em formalina em comparação ao sangue, evitando falsos negativos por autólise, permite diferenciar bovinos PI de bovinos com infecção aguda com uma só amostra e permite analisar terneiros neonatos já que os anticorpos colostrais não interferem na técnica (GROOMS & KEILEN, 2002; LERTORA et al, 2002; LERTORA et al, 2003; BRODERSEN, 2004).

A biópsia de tecido cutâneo (orelha) fixada em formol é considerada um tecido de escolha para diagnóstico do BVDV pela IHQ, sendo um método metuculoso e efetivo para detecção de bovinos infectados pelo BVDV, e eficiente técnica para diagnóstico de animais PI como já descrito anteriormente (NJAA et al, 2000; GROOMS & KEILEN, 2002; LERTORA et al, 2003; BRODERSEN, 2004; CORNISH et al, 2005). Além de efetiva a técnica permite testar um grande número de bovinos, com rapidez e com tecido de fácil coleta (CORNISH et al, 2005).

O BVDV causa perdas significativas à bovinocultura de corte e leite em todo mundo (TREMBLAY, 1996). Estudos têm demonstrado que a infecção pelo BVDV está amplamente difundida no rebanho bovino do Brasil, incluindo Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al, 1996; BOTTON et al, 1998; CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2000; BRUM et al, 2004; FLORES et al., 2004; SAMARA et al, 2004). O principal problema econômico é decorrente da infecção intra-uterina, que pode estar associada a uma variedade de sinais clínicos, como morte embrionária, aborto, mumificação, malformações e nascimento de terneiros PI (MOENNIG, 1995).

Os objetivos desse trabalho são relatar os achados clínicos e patológicos da infecção pelo BVDV encontrados no setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, detectar e avaliar a presença do antígeno viral pela IHQ nos fragmentos de diversos órgãos de bovinos e fetos abortados, e avaliar a IHQ em biópsias de pele como ferramenta de diagnóstico da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Agente etiológico.

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é classificado na família *Flaviviridae* e é membro do gênero *Pestivirus* (RADOSTITS et al, 2002). Três espécies de pestivírus são reconhecidas, o BVDV, a doença da fronteira (*border disease*) e peste suína clássica (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

Os vírions do BVDV são partículas esféricas com aproximadamente 50nm de diâmetro com um envelope firmemente aderido contendo glicopeptídeos (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; SCHUCH, 2001; POTGIETER, 2004). O genoma do BVDV consiste uma fita simples de RNA com polaridade positiva e contém um esqueleto genético que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

A alta frequência de mutações, a propensão à recombinação, e a pressão seletiva pela resposta imune estimulada por infecções naturais ou vacinação tem levado a criação de uma grande variedade de variantes genéticas e antigênicas do BVDV (BOLIN & GROOMS, 2004).

O BVDV tem dois grupos antigênicos designados como biotipos não-citopático (NCP) e citopático (CP), conforme seu efeito sobre as células da cultura tecidual (BAKER, 1987; NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; BOLIN & GROOMS, 2004). O sucesso da infecção pelo BVDV depende da habilidade do biotipo NCP do vírus em atravessar a placenta e estabelecer uma infecção persistente nos fetos em desenvolvimento (NETTLETON & ENTRICAN, 1995). Somente o biotipo NCP que desempenha essa função, crucial para disseminação do vírus (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al, 2002). Ele é causa de uma ampla série de doenças congênitas, entéricas e reprodutivas. Em contraste, o biotipo CP do vírus é geralmente associado com a doença das mucosas nos animais já persistentemente infectados (PI) com o biotipo NCP homólogo (BROWNLIE, 1990; BROWNLIE & CLARKE & HOWARD, 1984; NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; BOLIN & GROOMS, 2004). Ambos biotipos podem ser isolados de animais que estejam morrendo da doença das mucosas e há evidências de que o biotipo CP surge do NCP nos bovinos PI por

recombinações genéticas, nas quais estão incluídas a inserção do RNA hospedeiro ou a duplicação de seqüências de RNA virais (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; BOLIN & GROOMS, 2004).

O BVDV pode ser segregado em dois subgrupos denominados BVDV-I e BVDV-II (RADOSTITS et al, 2002). Os isolamentos do tipo I são os mais freqüentes e comumente usados na produção da vacina, testes e pesquisas diagnósticas (RADOSTITS et al, 2002). Os isolamentos do tipo II são provenientes predominantemente do soro fetal bovino, dos animais permanentemente infectados nascidos de mães vacinadas contra o BVDV e dos bovinos que morreram da forma aguda da doença, denominada doença hemorrágica (RADOSTITS et al, 2002).

## **2.2 Epidemiologia.**

O BVDV ocorre na maioria das regiões do mundo (POTGIETER, 2004). A infecção natural ocorre em bovinos, e também em ovinos, suínos, caprinos, ruminantes de vida livre ou de cativeiro (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004), e essas espécies, portanto, são consideradas fontes potenciais de infecção (HOUE, 1995), mas seu exato papel na epidemiologia ainda deve ser esclarecido (POTGIETER, 2004).

A prevalência da infecção por BVDV pode ser expressa como a prevalência de portadores de anticorpos ou a prevalência de bovinos PI (HOUE, 1995). Os títulos de anticorpos contra o BVDV obtidos pela infecção natural normalmente diminuem lentamente, e freqüentemente quando um animal é infectado, ele terá anticorpos contra o vírus por toda a vida (HOUE, 1995). Os programas de vacinação e a existência de bovinos PI que excretam o vírus são responsáveis pelos animais sorologicamente positivos em um rebanho (HOUE, 1995; RADOSTITS et al, 2002). Portanto, exceto em áreas que utilizam vacinação, a prevalência de portadores de anticorpos reflete a proporção de animais previamente expostos ao BVDV em algum momento de sua vida (HOUE, 1995). Rebanhos que contém bovinos PI têm alta proporção de animais soro-positivos (POTGIETER, 2004). Rebanhos com poucos animais imunes têm mais risco de infecção o que aumenta a suscetibilidade do rebanho ao BVDV e conseqüentemente a possibilidade de nascimento de bovinos PI (POTGIETER, 2004). O número de animais PI é determinado pela incidência de infecções agudas entre os animais soro negativos no começo da gestação e pela transmissão vertical pelos próprios bovinos PI (HOUE, 1995).

O BVDV é altamente infeccioso (LONERAGAN et al, 2005). A prevalência da infecção nos rebanhos é alta e nos bovinos acima de um ano de idade 60 a 80% possuem anticorpos neutralizantes séricos para o BVDV (RADOSTITS et al, 2002). Entretanto, a incidência da doença das mucosas clínica é baixa, pois normalmente a prevalência dos bovinos PI nos rebanhos é de aproximadamente 1 a 2% (RADOSTITS et al, 2002).

Os bovinos se infectam de duas maneiras (HOUE, 1995). A infecção pós-natal de bovinos que não tiveram exposição prévia ao vírus causa uma viremia transitória seguida de produção de anticorpos (HOUE, 1995). A infecção fetal no início da gestação, entre 90 e 120 dias, por outro lado, produzirá imunotolerância ao BVDV, o bovino nasce PI, e é nesse animal que ocorre a doença das mucosas (HOUE, 1995). Os bovinos PI são importantes na epidemiologia da doença por que eles são a fonte de infecção mais importante em um rebanho (HOUE, 1995; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). O sangue desses animais pode ter alta dose viral, da mesma forma a saliva, secreção nasal, sêmen, leite, urina e fezes (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004).

Em geral, os bovinos jovens são mais suscetíveis à infecção pelo BVDV, mas bovinos adultos podem desenvolver doença clínica, se infectados com genótipos altamente virulentos do vírus (RADOSTITS et al, 2002). A infecção persistente pode ser estabelecida apenas na primeira metade da vida fetal (RADOSTITS et al, 2002). Em comparação com muitos outros patógenos, a sobrevivência fetal após a infecção intra-uterina precoce com BVDV é comum, podendo ser de até 70% (RADOSTITS et al, 2002). Os animais não vacinados, inadequadamente vacinados ou aqueles cuja situação imune declinou são mais suscetíveis à infecção e possuem potencial para doença clínica (RADOSTITS et al, 2002). Os animais vacinados podem ser suscetíveis, se os isolamentos a campo do vírus forem distintos dos usados na vacina (RADOSTITS et al, 2002).

A transmissão pode ocorrer de forma vertical e horizontal (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). A transmissão vertical é de uma geração para outra (HOUE, 1995). Conseqüentemente, pode se dizer que todos os bovinos PI são produzidos pela transmissão vertical (HOUE, 1995). Porém, na maioria dos casos, ela é precedida da transmissão horizontal da mãe, e durante essa, o vírus atravessa a placenta e infecta o feto (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004).

A transmissão horizontal pode ser direta ou indireta (BAKER, 1987; HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). Contato direto entre bovinos suscetíveis e PI é um importante meio de transmissão (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). A transmissão por aerossóis em curtas

distâncias parece provável, mas as chances de ocorrer a infecção baixa rapidamente a medida que a distância entre os animais aumenta (POTGIETER, 2004). O sêmen de touros persistentemente infectados normalmente contém alta concentração de BVDV e pode resultar em baixo grau de concepção em novilhas ou vacas suscetíveis após criação ou inseminação (POTGIETER, 2004). Novilhas ou vacas inseminadas se tornam transitoriamente infectadas e, podem produzir bovinos PI (POTGIETER, 2004). Apenas uma pequena proporção de novilhas soro-negativas inseminadas com sêmen de touros transitoriamente infectados se torna infectada (POTGIETER, 2004). A transmissão indireta envolve um veículo para transmitir o patógeno entre os animais infectados e suscetíveis (HOUE, 1995) e depende da estabilidade do vírus fora do hospedeiro (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). Em laboratório, o vírus se mostrou estável a temperaturas abaixo de 10°C e em pH entre 3 e 9 (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004).

Amostras do tipo 2 têm sido identificadas predominantemente nos Estados Unidos e Canadá (CARMAN et al, 1998), com poucos relatos na Europa (WAKELEY et al, 2003) e no Brasil (CANAL et al, 1998; FLORES et al, 2000). O BVDV do tipo 2 não é sinônimo de maior virulência (CARMAN et al, 1998). O significado biológico da subdivisão utilizando diferenças antigênicas e genéticas permanece incerto e ainda não existem sinais laboratoriais dos graus de virulência para as cepas do BVDV do tipo 1 e tipo 2 (CARMAN et al, 1998).

## **2.3 Patogenia.**

A patogenia depende de fatores interativos múltiplos envolvendo as fases intra-uterina e pós-natal e de fatores imunológicos do hospedeiro (RADOSTITS et al, 2002).

### **2.3.1 Infecção pós-natal primária**

Em bovinos não-prenhes imunocompetentes a doença pode se apresentar nas formas subclínica, superaguda, trombocitopenia e síndrome hemorrágica e diarreia dos bezerros neonatais (RADOSTITS et al, 2002). Diarreia, febre e doença do trato respiratório inferior com leucopenia, anemia, trombocitopenia e índice de mortalidade de 10% são comumente encontrados (POTGIETER, 2004). Evidências experimentais sugerem que os isolados variam na sua virulência e capacidade de induzir trombocitopenia (POTGIETER, 2004).

Primeiramente o vírus se replica na mucosa nasal e posteriormente alcança altos títulos nas tonsilas (POTGIETER, 2004). Após ele se difunde aos linfonodos regionais seguido de disseminação sanguínea, associado a células (leucócitos), pelo corpo



(POTGIETER, 2004). A replicação viral normalmente se desenvolve nas tonsilas, timo e íleo (POTGIETER, 2004). Megacariócitos e linfócitos constituem importantes alvos do vírus (POTGIETER, 2004). O BVDV induz necrose dessas células e prejudica a função daquelas que sobrevivem à infecção (POTGIETER, 2004).

### **2.3.2 Infecção intra-uterina**

Os problemas relacionados ao BVDV durante a gestação são complexos (EVERMANN & RIDPATH, 2002). O andamento da infecção é dependente do momento da infecção (GROOMS, 2004) e existem fatores associados ao BVDV e à vaca gestante que contribuem para a vulnerabilidade do hospedeiro à infecção e doença (EVERMANN & RIDPATH, 2002). O fator viral é a variação da cepa viral, sendo o meio pelo qual o vírus pode ser mantido em uma população bovina (POTGIETER, 1995; EVERMANN & RIDPATH, 2002; GROOMS, 2004). Os fatores do hospedeiro associados com a infecção pelo BVDV são o estado imunológico da novilha no início da fase reprodutiva (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; EVERMANN & RIDPATH, 2002) e a imunodepressão fisiológica que ocorre durante a gestação (EVERMANN & RIDPATH, 2002; GROOMS, 2004).

A infecção de vacas prenhes não imunes pelo BVDV normalmente resulta em infecção transplacentária do feto (MOENNIG & LIESS, 1995; RADOSTITS et al, 2002; GROOMS, 2004). Embora os mecanismos de infecção fetal não sejam claros, evidências sugerem que o BVDV pode atravessar a placenta causando vasculite no lado materno da placenta permitindo o acesso à circulação fetal (GROOMS, 2004). A difusão transplacentária do BVDV durante viremia clinicamente inaparente ou aparente pode ser o evento mais crucial da infecção pelo BVDV (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Algumas cepas do BVDV podem ter baixa patogenicidade, conseqüentemente, seu efeito pode ser menos insidioso, resultando na manifestação de alterações morfológicas ou clínicas apenas após um efeito prolongado nos tecidos germinativos (BIELEFELDT-OHMANN, 1995).

Em condições experimentais ambos biotipos CP (BROWNLIE, CLARK & HOWARD, 1989) e NCP (DONE et al, 1980) podem causar infecções transplacentárias (POTGIETER, 2004) e morte fetal seguindo infecções de vacas soronegativas (GROOMS, 2004), mas o biotipo NCP é mais comumente envolvido que o primeiro (POTGIETER, 2004). Em bovinos prenhes imunocompetentes e nas infecções fetais o BVDV pode causar

significativa perda reprodutiva inicial, como falha de fertilização, mortalidade embrionária e abortamento (RADOSTITS et al, 2002; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004).

O vírus interfere na fertilização, mas não tem a habilidade de penetrar na zona pelúcida intacta (POTGIETER, 2004). A exposição dos bovinos ao vírus durante o ciclo estral antes da inseminação pode resultar em redução da taxa de concepção devido à falha de ovulação ou ovulação tardia (RADOSTITS et al, 2002). A inseminação de novilhas soronegativas e livres do vírus com o sêmen contaminado pode resultar em taxas de concepção deficientes inicialmente, seguida por concepção normal após soroconversão e nascimento de animais normais sem evidência de infecção com o vírus (RADOSTITS et al, 2002). Os mecanismos envolvidos na diminuição das taxas de concepção não são claros, mas dependem do estágio reprodutivo no momento da infecção (GROOMS, 2004).

Durante o primeiro trimestre de prenhez, embriões e fetos são muito suscetíveis ao vírus (KENDRICK, 1971; MOENNIG & LIESS, 1995; STOKSTAD & LOKEN, 2002; POTGIETER, 2004). O risco de ocorrer alterações patológicas no feto infectado (STOKSTAD & LOKEN, 2002), assim como morte fetal (KENDRICK, 1971; GROOMS, 2004) neste estágio é maior (STOKSTAD & LOKEN, 2002; GROOMS, 2004). A suscetibilidade é altamente correlacionada com a idade gestacional e ligada à ontogenia da resposta imune a qual se desenvolve de uma forma lenta (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS, 2002; POTGIETER, 2004). A infecção transplacentária em fetos até 100 dias pode resultar na sua morte e reabsorção ou expulsão após alguns dias ou meses (BROWN et al, 1974; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004).

O BVDV tem um importante efeito teratogênico em bovinos e pode suceder infecção transplacentária durante o segundo trimestre de gestação (entre 100 e 150 dias) (BROWN et al, 1974; POTGIETER, 2004). Este período de desenvolvimento fetal corresponde ao estágio final da organogênese e desenvolvimento do sistema imune fetal (BAKER, 1987; NETTLETON & ENTRICAN, 1995; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004). A infecção neste período resulta em destruição das células tronco, resultando em defeitos congênitos (BAKER, 1987). Os mecanismos envolvidos nas lesões induzidas pelo vírus incluem inibição do crescimento celular do sistema nervoso, olhos, sistema imune, tegumento, músculo e esqueleto e sistema respiratório (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; MOENNIG & LIESS, 1995; NETTLETON & ENTRICAN, 1995; POTGIETER, 2004). Embora não seja claro, a combinação da destruição celular direta pelo vírus e a resposta inflamatória ao vírus

tem sido proposta como mecanismo patogênico para os defeitos teratogênicos (GASTRUCCI et al, 1990; GROOMS, 2004).

Infecções transplacentárias pelo BVDV durante o terceiro trimestre de prenhez em bovinos geralmente não resultam em doença fetal e são análogas as infecções primárias pós-natais (MOENNIG & LIESS, 1995; POTGIETER, 2004). Nesse estágio os fetos montam uma resposta imune relativamente normal e freqüentemente nascem com anticorpos circulantes para o vírus (STOKSTAD & LOKEN, 2002; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004).

Algumas infecções do feto pelo biotipo NCP antes do desenvolvimento da competência imune pode resultar numa imunotolerância específica ao vírus (MOENNIG & LIESS, 1995; NETTLETON & ENTRICAN, 1995; STOKSTAD & LOKEN, 2002; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004), uma vez que os anticorpos maternos não atravessam a placenta (STOKSTAD & LOKEN, 2002). Essa infecção é incomum após os 100 dias de gestação, embora ela possa ocorrer até o 125º dia (GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004). A imunotolerância resulta no nascimento de bovinos PI que são virêmicos e continuamente disseminam o vírus (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004). Embora o mecanismo exato da imunotolerância não seja claro, geralmente parece que a circulação do vírus durante o período de gestação quando a imunocompetência é desenvolvida (90-120 dias) é pré-requisito para persistência (GROOMS, 2004). A persistência para a infecção pelo BVDV em bovinos parece ocorrer por imunotolerância específica dos linfócitos T e B (McCLURKIN et al, 1984; GROOMS, 2004) o que resulta na ausência de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes ao vírus persistente (GROOMS, 2004).

Em geral nos bovinos PI a tolerância imune ao BVDV é altamente específica, esses podem ser imunocompetentes, pelo menos em grau, as infecções por BVDV antigenicamente diferentes, as quais se ligam a epítomos diferentes do vírus persistente (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; BOLIN & GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004). Portanto, embora um bovino PI seja normalmente soronegativo, ele pode apresentar anticorpos para BVDV por exposição natural ou vacinação, diferentes antigenicamente (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). Os anticorpos contra BVDV, adquiridos passivamente, declinam mais rapidamente em bovinos PI em comparação a bovinos normais (POTGIETER, 2004). A detecção de variantes genéticas em bovinos PI sugere que esses animais podem aumentar a

diversidade do BVDV servindo como fonte de variantes virais que podem infectar outros bovinos (BOLIN & GROOMS, 2004). Isso explica a presença de anticorpos neutralizantes que são ocasionalmente encontrados em animais PI sem história de contato com fontes externas de BVDV (BOLIN & GROOMS, 2004).

Os bovinos PI podem parecer clinicamente normais ou subdesenvolvidos e pequenos para sua idade (LARSSON et al, 1994; RADOSTITS et al, 2002), têm maior risco de desenvolver doenças secundárias como pneumonias e enterites, podem morrer durante o primeiro ano de vida (POTGIETER, 2004) e ocasionalmente podem sobreviver e permanecer saudáveis por até cinco anos (RADOSTITS et al, 2002). Os bezerros tanto com infecções transitórias como infecções persistentes pelo BVDV apresentam concentrações séricas dos hormônios tireoidianos inferiores ao normal, podendo afetar o desenvolvimento do sistema esquelético, causando retardo do crescimento (LARSSON et al, 1995; MOENNIG & LIESS; 1995; RADOSTITS et al, 2002).

A doença das mucosas ocorre quando um bovino PI é superinfectado com um vírus CP homólogo antígenicamente ao vírus NCP residente (RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). O vírus CP deriva, provavelmente, do vírus NCP residente no bovino PI por rearranjo do seu genoma, porém sua origem pode ser de fontes externas, como ocorre em surtos associados à vacinação (POTGIETER, 2004). O evento mutacional responsável pela mudança do biotipo NCP para o biotipo CP não afeta a antigenicidade (RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). Os bovinos acometidos não respondem sorologicamente ao vírus CP homólogo (RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). A infecção por um vírus CP heterólogo antígenicamente resulta em doença das mucosas atípica, vários meses mais tarde ou o animal infectado pode não responder sorologicamente ao vírus citopático heterólogo (BROWNLIE, 1990; RADOSTITS et al, 2002). O período de incubação pode variar de 98 a 138 dias (BROWNLIE, 1990). Permanece incerto quando o biotipo CP resultante de superinfecção homóloga resultou de mutação ou recombinação (BROWNLIE, 1990).

A doença das mucosas segue um curso agudo e crônico (POTGIETER, 2004). O último pode continuar por até 18 meses (POTGIETER, 2004). Os fatores que influenciam o curso da doença não são conhecidos e se existe uma relação entre o início precoce ou tardio da doença das mucosas e a duração dos sinais clínicos, essa ainda não foi determinada (POTGIETER, 2004).

### 2.3.3 Imunodepressão

Existem evidências de que as infecções pós-natais pelo BVDV dos bovinos possam causar imunodepressão e estimular o desenvolvimento de outras doenças infecciosas (RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004) e ser o fator crucial na patogenia das doenças de etiologia múltipla, como pneumonias e enterites (POTGIETER, 1995; RADOSTITS, 2002). Contudo, essa evidência é controversa e deve-se levar em conta os mecanismos imunes dos bovinos PI comparados aos animais com infecções primárias (RADOSTITS et al, 2002).

O vírus tem uma afinidade por células de defesa e a consequência da infecção é a destruição de algumas dessas células e prejuízo funcional das células sobreviventes, sendo esta última a causa mais importante da imunodepressão induzida por vírus (POTGIETER, 2004). Os linfócitos e macrófagos constituem um importante alvo para a replicação do BVDV (POTGIETER, 1995). A destruição linfóide resulta em variados graus de depleção linfóide em bovinos infectados (POTGIETER, 1995; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004), mesmo nos que permanecem clinicamente saudáveis (POTGIETER, 1995). Leucopenia transitória ocorre na maioria dos bovinos infectados pelo BVDV (POTGIETER, 2004), e neutropenia não é incomum (POTGIETER, 1995; RADOSTITS et al, 2002).

Bovinos PI têm uma baixa proporção de linfócitos B circulantes funcionais, mas o número absoluto de linfócitos permanece relativamente normal (POTGIETER, 2004). As infecções pós-natais primárias, entretanto, causam redução transitória no número absoluto dos linfócitos B e linfócitos T, bem como na porcentagem de linfócitos T (RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004).

A infecção intercorrente pelo BVDV tem o potencial de exacerbar a patogenicidade de outros patógenos ou mudar o caráter da doença causada por esses patógenos (POTGIETER, 1995; POTGIETER, 2004). Infecções concomitantes de BVDV e BHV-1 em bovinos resultam em doença clínica severa afetando o trato respiratório, tecido ocular e trato alimentar, e muitas vezes, a infecção oportunista por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* aparentemente favorece a severidade das lesões no trato respiratório (POTGIETER, 1995; POTGIETER, 2004). Existe a hipótese de que o BVDV subclínico pode ser um importante contribuinte para a incidência de doença severa do trato respiratório (POTGIETER, 2004).

O BVDV pode contribuir para a patogenia das doenças do trato respiratório como agente primário ou através da imunodepressão (LONERAGAN et al, 2005). Nos surtos de

doença respiratória nos bezerros e bovinos adultos causados por múltiplas infecções virais, o BVDV é freqüentemente o agente viral mais constante, o que pode indicar que o vírus é um importante patógeno contribuinte na doença respiratória dos bovinos (RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). O BVDV pode agir sinergicamente com outros patógenos respiratórios (RADOSTITS et al, 2002; LONERAGAN et al, 2005) para facilitar a colonização bacteriana do trato respiratório inferior (LONERAGAN et al, 2005), mas a participação do BVDV em infecções sinérgicas não é freqüentemente reconhecida devido à ausência de lesões clássicas da doença das mucosas (POTGIETER, 2004). Contudo, também é possível que o vírus possa estar coincidentemente presente em alguns animais e não ter efeito adverso (RADOSTITS et al, 2002). Portanto, a presença do vírus nos tecidos do trato respiratório dos bovinos acometidos com pneumonia é difícil de interpretar (RADOSTITS et al, 2002). Observações a campo sugerem que a introdução da infecção pelo BVDV em um rebanho suscetível, pode estar relacionada com uma incidência aumentada de pneumonia viral e bacteriana nos bezerros, que pode se manter por até dois anos (RADOSTITS et al, 2002).

Outras doenças infecciosas que o BVDV pode exacerbar incluem a actinomicose, estomatite papular, enterite por *Salmonella* sp, infecção por *Escherichia coli*, babesiose, helmintose aguda, metrite e mastite (POTGIETER, 1995; POTGIETER, 2004).

## **2.4 Sinais Clínicos**

A manifestação dos sinais clínicos após a infecção pelo BVDV é complexa e dependente de múltiplos fatores: agente, hospedeiro e ambiente (BOLIN & GROOMS, 2004). Os fatores do hospedeiro que podem influenciar os sinais clínicos da infecção incluem o quanto o hospedeiro é imunocompetente ou imunotolerante ao BVDV, estado imune (passivo pelos anticorpos colostrais ou ativo pela exposição ao BVDV ou vacinação), gestação nas fêmeas, idade gestacional do feto no momento da infecção, nível de estresse ambiental no momento da infecção e concorrência com outros patógenos (RADOSTITS et al, 2002; BOLIN & GROOMS, 2004).

Tradicionalmente, as manifestações da infecção pelo BVDV são apresentadas em três categorias: infecção pós-natal ou BVD, infecção fetal e doença das mucosas (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004).

## **2.4.1 Infecção pós-natal primária**

### 2.4.1.1 Infecção subclínica

Esta é a consequência mais comum de infecção primária pós-natal pelo BVDV em bovinos (POTGIETER, 2004). A maioria das infecções (70 a 90%) em bovinos adultos suscetíveis são subclínicas (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Uma observação mais cuidadosa pode revelar leucopenia, piroxia e, em algumas vacas, diminuição da produção de leite (POTGIETER, 2004). Bovinos que apresentam infecção subclínica ou doença discreta podem estar virêmicos em 4 a 15 dias após a infecção e desenvolver anticorpos séricos contra o BVDV em duas a quatro semanas após a exposição (POTGIETER, 2004).

### 2.4.1.2 Diarréia viral bovina

A diarréia viral bovina se refere à infecção aguda em bovinos soronegativos e imunocompetentes (BAKER, 1987). A mortalidade é relativamente negligenciada, mas mais que 8% tem sido relatadas, enquanto que a morbidade fica em torno de 30 a 90%. (POTGIETER, 2004).

Afeta geralmente animais de seis meses a dois anos (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Os sinais clínicos podem ser evidentes por cinco a sete dias e incluem febre transitória, leucopenia, depressão, anorexia, descarga óculo-nasal, salivação, ocasionalmente erosões e ulcerações orais, diarréia aquosa de severidade variada e, em vacas, diminuição da produção leite (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

### 2.4.1.3 Diarréia viral bovina severa ou síndrome hemorrágica

A doença é caracterizada por um súbito quadro de depressão, piroxia, leucopenia, trombocitopenia, diarréia, descarga nasal, salivação, úlceras orais e diminuição da produção de leite (POTGIETER, 2004). Posteriormente a doença é caracterizada por diarréia sanguinolenta, hemorragias petequiais e equimóticas difusas (POTGIETER, 2004).

O grau de morbidade é superior a 40% e de mortalidade é de 10 a 25% (POTGIETER, 2004). Surtos são frequentemente associados à introdução de bovinos ao rebanho ou programas de vacinação inadequados (POTGIETER, 2004). Na maior parte desses casos tem sido isolado o BVDV do tipo 2 (BOLIN & GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004).

## **2.4.2 Infecção uterina (congênita)**

### **2.4.2.1 Fertilidade e aborto**

Inseminação artificial com sêmen contaminado ou monta natural com um touro infectado com BVDV pode causar baixas taxas de prenhez em consequência do baixo grau de concepção, morte embrionária ou fetal, desenvolvimento embrionário prejudicado (LARSSON et al, 1994; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004) e retenção de placenta (LARSSON et al, 1994).

Infecção fetal nos primeiros 30 dias de gestação pode diminuir as taxas de gestação e gerar perdas embrionárias (STOKSTAD & LOKEN, 2002). Por outro lado, a infecção fetal nos 50 a 100 dias de gestação possivelmente causa morte fetal e subsequente expulsão ou mumificação fetal dias ou meses após a infecção (POTGIETER, 2004). As taxas de aborto variam e geralmente são baixas e abortos tardios são raros (POTGIETER, 2004).

### **2.4.2.2 Defeitos congênitos**

Defeitos congênitos ocorrem em fetos infectados entre os 100 e 150 dias de gestação (BAKER, 1987; STOKSTAD & LOKEN, 2002; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004). O vírus atua no sistema nervoso central e tecido ocular em particular (GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004).

Bovinos com hipoplasia cerebelar ou outra anomalia cerebral tem dificuldade de movimentação, de permanecer em estação, afastando os membros, e apresentam tremores (SCHILD et al, 2001; POTGIETER, 2004). Catarata, cegueira e opacidade da córnea podem ocorrer nesses bovinos (POTGIETER, 2004).

### **2.4.2.3 Bovinos persistentemente infectados**

Se a infecção ocorre entre os 30 e 120 dias de gestação, o vírus pode atravessar a placenta, infectar feto e induzir uma infecção persistente. Os anticorpos maternos não atravessam a placenta bovina, e devido ao feto ainda não ter estabelecido uma imunocompetência contra o BVDV, ele não tem defesa contra o vírus (STOKSTAD & LOKEN, 2002).



### 2.4.3 Doença das mucosas (DM)

Duas formas de doença das mucosas têm sido descritas: forma aguda e forma crônica (POTGIETER, 2004). Geralmente a doença é esporádica e ocorre entre 6 e 24 meses de idade e é fatal em aproximadamente 100% dos casos (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

A DM aguda é caracterizada por pirexia, depressão, fraqueza, anorexia, taquicardia, diarreia líquida profusa, que pode ser hemorrágica, desidratação, acidose e emaciação (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). O exame cuidadoso da cavidade oral pode revelar lesões erosivas envolvendo os lábios, margens gengivais, língua, comissuras labiais e parte posterior do palato duro (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Lesões semelhantes podem ocorrer no focinho, cavidade bucal, mucosa vulvar e pele dos tetos (POTGIETER, 2004). Salivação e secreção ocular mucopurulenta de severidade variada são sinais clínicos comuns (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Eventualmente ocorre edema de córnea (POTGIETER, 2004). A diarreia se desenvolve dois ou três dias após o início dos sinais clínicos, porém em casos hiperagudos o animal pode morrer antes (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). As fezes são aquosas e frequentemente fétidas e podem conter restos necróticos, sangue e fibrina (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

O curso da DM aguda varia aproximadamente de dois a vinte um dias (POTGIETER, 2004). Leucopenia manifestada por neutropenia e por linfopenia pode estar evidente nos primeiros estágios doença (POTGIETER, 2004). Infecções secundárias são comuns nesses animais (POTGIETER, 2004). Existe um relato de ocorrência de diabetes melito em bovino com DM (POTGIETER, 2004).

Os sinais clínicos da DM crônica são similares àqueles observados na forma aguda, mas são menos severos e o curso é prolongado (mais de dezoito meses) (POTGIETER, 2004). A doença é caracterizada por inapetência, anorexia, emaciação progressiva, diarreia contínua ou intermitente e secreção óculo-nasal (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Lesões de pele são comuns em bovinos cronicamente infectados e são caracterizadas por áreas de alopecia e hiperqueratose ou eczema na região do pescoço (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Erosões crônicas frequentemente são encontradas na boca e envolvendo a pele (BAKER, 1987), incluindo as áreas perineal, vulvar e prepucial, junção pele chifre, fenda interdigital e cascos (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Claudicação crônica pode se desenvolver como resultado de laminite ou necrose interdigital (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Anemia, neutropenia e linfopenia usualmente estão presentes

(POTGIETER, 2004). Infecções secundárias são comuns (POTGIETER, 2004). Os bovinos afetados finalmente morrem pela debilidade (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

## **2.5 Patologia**

O BVDV tem sido associado com patologia em inúmeros sistemas incluindo o respiratório, hematológico, imunológico, neurológico e reprodutivo (GROOMS, 2004).

Os achados de necropsia e histologia variam de acordo com o curso e evolução da doença (RADOSTITS et al, 2002). As lesões são resultados da interação de fatores como o biotipo do vírus, o genótipo hospedeiro, idade, estado imune do animal no momento da infecção, da resposta imune induzida, e infecções intercorrentes ou outros fatores estressantes (BIELEFELDT-OHMANN, 1995).

### **2.5.1 Infecção primária após nascimento**

É difícil diferenciar entre as alterações patológicas induzidas pela infecção após o nascimento das produzidas pela doença das mucosas (POTGIETER, 2004).

A infecção pós-natal aguda pode ser subclínica, leve ou severa (POTGIETER, 2004). As lesões patológicas são basicamente as mesmas, porém o grau de manifestação varia de acordo com cada animal (POTGIETER, 2004).

A principal lesão macroscópica desta forma de BVDV é uma enterite acompanhada de edema e hemorragias petequiais ou equimóticas especialmente no íleo distal e cólon proximal (WILHELMSSEN et al, 1990; POTGIETER, 2004). Erosões simples ou múltiplas na mucosa oral e esofágica estão invariavelmente presentes (POTGIETER, 2004). As lesões que ocorrem no tecido linfóide são semelhantes àquelas descritas na doença das mucosas, como o aumento de volume e edema nos linfonodos mesentéricos (WILHELMSSEN et al, 1990). Pode ocorrer linfadenite nos linfonodos mesentéricos (POTGIETER, 2004).

O BVDV do tipo 2 causa hemorragias petequiais e equimóticas generalizadas que podem ocorrer na esclera, conjuntiva, endocárdio, epicárdio, superfícies serosa e mucosa do trato gastrointestinal, baço, maioria dos linfonodos, cavidade oral, musculatura esquelética e bexiga. Osteopetrose pode estar associada às infecções naturais (POTGIETER, 2004).

As alterações histológicas normalmente são confinadas aos sistemas digestivo, linfóide e respiratório (POTGIETER, 2004). As lesões inflamatórias, edema da submucosa e mucosa do trato gastrointestinal manifestam-se pela dilatação dos vasos linfáticos da

submucosa e pela separação das fibras do músculo liso da camada interna da túnica muscular (POTGIETER, 2004). Linfocitólise folicular nos nódulos linfóides da mucosa intestinal e nos linfonodos mesentéricos é comum e depleção linfóide no parênquima do baço também pode ocorrer (WILHELMSSEN et al, 1990; POTGIETER, 2004). As hemorragias petequiais, quando presentes, ocorrem nas áreas folicular e paracortical e sua patogenia continua incerta (WILHELMSSEN et al, 1990; POTGIETER, 2004).

Infecções pelo BVDV do tipo 2 têm resultado em broncopneumonia multifocal, atrofia da medula óssea vermelha e necrose e erosões na membrana mucosa do trato gastrointestinal (POTGIETER, 2004).

### **2.5.2 Infecção uterina (congênita)**

Infecções fetais no primeiro trimestre de gestação resultam em morte embrionária ou fetal seguida de absorção, mumificação ou aborto com expulsão ocorrendo em qualquer momento ou alguns meses depois (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004). A presença de anticorpos em fetos, como em neonatos não lactentes, indica que ocorreu infecção intra-uterina, mas seu significado diagnóstico, com referência ao abortamento, não está claro (RADOSTITS et al, 2002). O isolamento do vírus do feto ou a demonstração do antígeno viral dentro dos tecidos fetais são sugestivas de um diagnóstico de abortamento pestiviral (RADOSTITS et al, 2002). Embora se pensasse que o BVDV tivesse efeito no desenvolvimento embriológico, notou-se que mudanças inflamatórias do útero seguidas da infecção pelo BVDV resultam em ambiente incompatível ao desenvolvimento fetal (GROOMS, 2004).

As lesões associadas com abortamento pelo BVDV consistem principalmente de reações inflamatórias necrosantes (POTGIETER, 2004) presentes na pálpebra fetal, pulmão e miocárdio (RADOSTITS et al, 2002), mas não são características e raramente são observadas devido à autólise fetal (POTGIETER, 2004). Difíceis de serem observadas até mesmo em fetos não autolisados. O principal achado é a depleção do timo (CORBELLINI, 2005)<sup>1</sup>.

Lesões macroscópicas incluem aumento de tamanho do baço, linfonodos e fígado (POTGIETER, 2004). Os achados histológicos se caracterizam por infiltrado mononuclear, principalmente histiocitário, na região periportal do fígado, no miocárdio, baço e linfonodos (POTGIETER, 2004).

As lesões teratogênicas reconhecidas como possíveis conseqüências de infecção intra-uterina incluem a hipoplasia cerebelar (BAKER, 1987; BIELEFELDT-OHMANN, 1995; SCHILD et al, 2001; POTGIETER, 2004), desmielinização da medula espinhal, hidranecefalia, porencefalia e hidroencefalia (BAKER, 1987; BIELEFELDT-OHMANN, 1995; HEWICKER-TRAUTWEIN & TRAUTWEIN, 1994; HEWICKER-TRAUTWEIN et al, 1995; POTGIETER, 2004), catarata, degeneração e displasia retiniais, coriorretinopatia e hipoplasia, atrofia e neurite dos nervos ópticos (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004). Outros defeitos congênitos causados pelo vírus são o bragnatismo, hipotricose, artogripose, retardo do crescimento e hipoplasia pulmonar e do timo (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004) e alopecia parcial (KENDRICK, 1971).

O exame histológico indica que as lesões teratogênicas estão associadas ao retardo do desenvolvimento, alterações degenerativas e processos inflamatórios (POTGIETER, 2004). A hipoplasia cerebelar é caracterizada por redução da camada molecular e número de células da camada granular e da redução e substituição das células de Purkinje (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; GROOMS, 2004; SCHILD et al, 2001; POTGIETER, 2004). Em casos tardios, remanescentes de processos inflamatórios, como infiltrado leucocitário, ainda podem ser evidentes (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Em outros casos, a desmielinização parece ser o achado mais evidente (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004).

A hipoplasia ou atrofia de timo tem chamado muito atenção e existem especulações quanto ao efeito imunodepressivo significativo do BVDV (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Embora o BVDV esteja presente no timo no nascimento, nem sempre resulta em hipoplasia (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). O retardo do crescimento, mais freqüentemente notado em bovinos PI tem implicação importante com relação à síndrome do novilho fraco (BIELEFELDT-OHMANN, 1995).

### **2.5.3 Infecção persistente**

Bovinos PI podem apresentar malformações como retardo no crescimento devido à infecção uterina (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Entretanto, muitos desses bovinos não demonstram lesões macroscópicas e tem aparência normal (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). Alguns animais podem apresentar evidências histológicas da infecção (BIELEFELDT-OHMANN, 1995) como nefrite intersticial mononuclear, hepatite portal

mononuclear discreta, necrose focal e infiltrado mononuclear no epitélio do esôfago e da língua (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004), encefalite mononuclear e hiperplasia linfóide peribronquiolar (POTGIETER, 2004).

Em animais com retardo no crescimento, alterações macroscópicas e histológicas da pele podem estar presentes (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Macroscopicamente observam-se lesões erosivas superficiais com escamação interdigitais e em volta de orifícios (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Histologicamente, as lesões podem variar de leve atenuação de pregas e infiltrado discreto mononuclear na derme, a mudanças mais pronunciadas como paraqueratose e hiperqueratose (BIELEFELDT-OHMANN, 1995).

#### **2.5.4 Doença das mucosas**

A doença das mucosas (DM) é caracterizada por lesões necróticas de severidade variada, principalmente no trato digestivo, tegumentar e linfóide (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004). As manifestações clínicas e achados patológicos da doença das mucosas podem ser extremamente variados, embora isso ocorra mais em grau do que em tipo (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; TENORIO et al, 2000). A debilidade, emaciação e infecções secundárias são comumente associadas com a forma crônica (POTGIETER, 2004). De acordo com estudo de Tenório et al,(2000) o exame macroscópico revela apenas diferenças sutis entre as formas aguda e crônica da doença das mucosas e histologicamente, existe similaridade entre o tipo de lesão, porém com distribuição diferente. Portanto a diferenciação entre as duas formas apenas pelos exames macroscópicos e histológicos é difícil (CARMAN et al, 1998).

As alterações macroscópicas da DM aguda usualmente incluem erosões ou ulcerações superficiais características em mucosas ou epitélio do focinho, lábios, cavidade oral e cavidade nasal (BAKER, 1987; BIELEFELDT-OHMANN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004) e em menor extensão na faringe e laringe (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; RADOSTITS et al, 2002). No esôfago, essas erosões são lineares e mais comuns no terço superior (BARKER et al, 1993) e estendem-se na direção das pregas da mucosa esofágica (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; RADOSTITS et al, 2002). Lesões erosivas podem estar presentes nos pilares do rúmen, retículo e abomaso (RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). Edema e hemorragias na submucosa podem estar associados às erosões no abomaso (BAKER, 1987; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004).

As lesões intestinais têm natureza e extensão variadas e podem aparecer como enterite catarral, hemorrágica, fibrino-necrótica e/ou ulcerativa (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004). No intestino delgado as lesões macroscópicas estão freqüentemente limitadas à mucosa sobre as placas de Peyer e não são encontradas alterações distintas na mucosa adjacente (LIEBLER-TENORIO, 2000), freqüentemente parecendo normal exceto pela congestão, flacidez e edema irregulares ou difusos em alguns casos (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; RADOSTITS et al, 2002). As placas de Peyer podem estar severamente aprofundadas em relação à mucosa e freqüentemente recobertas por fibrina e sangue coagulado (LIEBLER-TENORIO, 2000; RADOSTITS et al, 2002). O tecido linfóide pode estar com aparência nodular (LIEBLER-TENORIO, 2000), necrótica, hemorrágica (BAKER, 1987; BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004). Essas lesões são características e comparadas somente com as encontradas na peste bovina e na febre catarral maligna (RADOSTITS et al, 2002). No intestino grosso, a mucosa pode estar congesta (RADOSTITS et al, 2002) e com erosões no cólon proximal (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Outras alterações linfóides incluem atrofia de timo e aumento dos linfonodos periféricos (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004).

As lesões da forma superaguda da DM são similares as lesões da forma aguda e geralmente não é possível diferenciar entre as duas formas com base nos achados macroscópicos e histopatológicos (RADOSTITS et al, 2002). Pode haver ausência de lesões entéricas macroscópicas, especialmente nos animais que morrem dentro de 24 horas após o início dos sinais clínicos e nos bezerros com menos de seis meses de idade (RADOSTITS et al, 2002). Nesses casos superagudos, pneumonia pode ser a lesão mais evidente (RADOSTITS et al, 2002). Os casos nos quais há hemorragia disseminada atribuível a trombocitopenia também podem ser uma forma da infecção superaguda (RADOSTITS et al, 2002).

Classicamente os achados da DM crônica e as lesões do trato digestivo superior são geralmente menores e mais discretas que as encontradas na forma aguda da doença (LIEBLER-TENORIO, 2000; POTGIETER, 2004). Podem ocorrer jejunites, ileíte e colite ulcerativas (LIEBLER-TENORIO, 2000). As lesões de pele, entretanto, são características da doença crônica (POTGIETER, 2004). Essas se apresentam como erosões, eczemas ou hiperqueratose e estão mais proeminentes nas regiões do períneo, pescoço, fissura interdigital e banda coronária (POTGIETER, 2004). Pode ocorrer infecção bacteriana

secundária nessas lesões (POTGIETER, 2004). As lesões eczematosas são caracterizadas por hiperqueratose, paraqueratose, hipotricose e alopecia (POTGIETER, 2004).

Histologicamente, as lesões do trato digestivo superior são representadas pela perda das células epiteliais no estrato basal e espinhoso e infiltrado de macrófagos e linfócitos no epitélio e lâmina própria (LIEBLER-TENORIO, 2000; POTGIETER, 2004), sendo este um dos primeiros eventos no epitélio queratinizado (POTGIETER, 2004), seguido de hemorragia e necrose celular resultando em focos de necrose circunscrita no estrato espinhoso cobertos pelo estrato córneo intacto (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). As erosões se desenvolvem quando a integridade do estrato córneo é perdida (POTGIETER, 2004). Ulcerações e erosões ocorrem no abomaso e são comuns nos bovinos na forma aguda e crônica (LIEBLER-TENORIO, 2000). Pode ocorrer degeneração e necrose do epitélio das criptas resultando em acúmulo de restos celulares (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004), essas podem ficar ocluídas e dilatadas com achatamento do epitélio e desaparecimento de microvilosidades (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Em alguns casos, ou em algumas áreas do intestino, pode ocorrer metaplasia de células mucóides, acompanhada de produção excessiva e acúmulo de muco (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004) e infiltrado mononuclear, predominantemente histiocitário, na lâmina própria (POTGIETER, 2004), epitélio das criptas, vilosidades e tecido linfóide (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; POTGIETER, 2004).

Na DM aguda, apoptose de células do córtex do timo pode ocorrer de forma acentuada (POTGIETER, 2004). A presença de macrófagos no córtex pode ocorrer (POTGIETER, 2004). Nos casos crônicos da DM há alteração estrutural do timo e atrofia do córtex (POTGIETER, 2004). Nas placas de Peyer ocorre depleção acentuada das células mononucleares e alteração da arquitetura normal na doença aguda (LIEBLER-TENORIO, 2000; POTGIETER, 2004). Nos casos crônicos ocorre atrofia tecido linfóide folicular, hemorragia e, freqüentemente, subdesenvolvimento do epitélio das criptas (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; RADOSTITS et al, 2002; POTGIETER, 2004). Outras alterações incluem edema nas camadas subepiteliais, hiperemia e diapedese (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Alterações nos linfonodos incluem depleção linfóide da periferia e dos folículos primários e secundários (POTGIETER, 2004). No baço a depleção linfóide ocorre em torno da bainha periarteriolar linfóide (POTGIETER, 2004) e pode ser observado variado grau de necrose

dos centros germinativos (BAKER, 1987), o que pode ocorrer também nos linfonodos (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

## **2.6 Diagnóstico**

O diagnóstico clínico da doença das mucosas é geralmente feito com base na presença de achados clínicos e patológicos característicos (RADOSTITS et al, 2002). Vários são os exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico definitivo, como o isolamento ou detecção de antígenos virais e ou a demonstração da resposta sorológica ao vírus (RADOSTITS et al, 2002; SALIKI & DUBOVI, 2004). O material a ser remetido depende da história clínica e do rebanho, se houver ou não a suspeita de infecções persistentes ou agudas, e a história de vacinação, necessária para interpretar a sorologia (RADOSTITS et al, 2002).

### **2.6.1 Isolamento viral**

O isolamento viral é um método confiável para o diagnóstico das infecções pelo BVDV (SALIKI & DUBOVI, 2004). O vírus cresce em muitas linhas celulares de várias espécies animais (SALIKI & DUBOVI, 2004). Entretanto, apenas três linhas são amplamente utilizadas no diagnóstico laboratorial para o isolamento do BVDV: BT, Btest e MDBK (SALIKI & DUBOVI, 2004).

As cepas do vírus podem ser caracterizadas *in vitro* como biotipos CP ou NCP (RADOSTITS et al, 2002). As cepas citopáticas causam alterações celulares *in vitro* características, evidentes nas culturas celulares inoculadas dentro de 48 horas, sendo essa a forma mais isolada a campo, segundo Radostits et al, 2002 e Saliki & Dubovi, 2004.

No animal vivo, a melhor amostra para isolamento do BVDV é o sangue total (RADOSTITS et al, 2002; SALIKI & DUBOVI, 2004). Podem ser utilizados também a camada leucocitária ou soro do sangue para culturas celulares (RADOSTITS et al, 2002). À necropsia, as melhores amostras são os órgãos linfóides, como baço, placas de Peyer do intestino delgado, linfonodos mesentéricos e timo (SALIKI & DUBOVI, 2004).



## 2.6.2. Detecção do antígeno

Como os métodos de isolamento viral requerem um período prolongado de tempo, os métodos de diagnóstico alternativos, como a imunistoquímica, estão ganhando importância, por serem mais baratos, rápidos e sensíveis para o diagnóstico de BVDV (HAINES et al, 1992; BASZLER et al, 1995; SALIKI & DUBOVI, 2004).

### 2.6.2.1 Imunistoquímica (IHQ)

O antígeno do BVDV pode ser rapidamente identificado nas amostras teciduais, utilizando métodos imunistoquímicos (RADOSTITS et al, 2002). Um anticorpo monoclonal 15C5, que reage com a proteína E0 (gp48), demonstrou reagir amplamente com a maioria das cepas do BVDV, podendo ser usado para detectar o antígeno do BVDV nos tecidos fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina, o que possui amplas aplicações diagnósticas e de pesquisa (RADOSTITS et al, 2002; LERTORA et al, 2002; LERTORA et al, 2003; BRODERSEN, 2004; SALIKI & DUBOVI, 2004). O gene que codifica E0 do BVDV tem uma alta seqüência homóloga entre os pestivírus e, adicionalmente, o E0 é adequado para sistemas de detecção, nos quais uma grande variedade de isolados podem ser detectados (BRODERSEN, 2004).

A IHQ é uma ferramenta de detecção sensível e específica dos antígenos do BVDV em bovinos afetados (BRODERSEN, 2004). A pele dos animais PI é um dos tecidos na qual o BVDV pode ser consistentemente identificado pela IHQ, é uma amostra acessível (NJAA et al, 2000; LERTORA et al, 2002; BRODERSEN, 2004) e tem resultado numa técnica capaz de testar bovinos jovens sem interferência de anticorpos colostrais (NJAA et al, 2000; LERTORA et al, 2003; BRODERSEN, 2004). Outra técnica também estudada é a IHQ dos bulbos pilosos com resultado positivo (LERTORA et al, 2002).

A técnica é capaz de diferenciar bovinos PI dos bovinos não permanentemente infectados, previamente diagnosticados pelos métodos ELISA, PCR e isolamento viral (LERTORA et al, 2002; LERTORA et al, 2003). Estudos demonstram algumas vantagens da técnica de IHQ frente às demais, como a estabilidade das amostras fixadas em formalina em comparação ao sangue, evitando falsos negativos por autólise, permite diferenciar bovinos PI de bovinos com infecção aguda com uma só amostra e permite analisar bezerros neonatos já que os anticorpos colostrais não interferem na técnica (GROOMS & KEILEN, 2002; LERTORA et al, 2003; BRODERSEN, 2004).

Na maioria dos casos, animais com infecção aguda não demonstram uma quantidade significativa de antígeno em tecido cutâneo (NJAA et al, 2000; BRODERSEN, 2004; SALIKI & DUBOVI, 2004) e a marcação positiva na IHQ, quando ocorre, é discreta (NJAA et al, 2000). A presença de antígeno na biópsia de pele é um forte indicativo que o BVDV estava no rebanho por um tempo significativo, evidenciado pela presença de um animal PI (SALIKI & DUBOVI, 2004), possibilitando a oportunidade de estudo de fatores epidemiológicos frente à presença de animais PI no rebanho (LONERAGAN et al, 2005).

#### 2.6.2.2 ELISA

O teste de ELISA é capaz de detectar, com rapidez e precisão, os antígenos específicos para o Pestivírus nos leucócitos sanguíneos periféricos, nos coágulos sanguíneos e amostras teciduais dos bovinos PI (RADOSTITS et al, 2002). Demonstra boa concordância com os procedimentos de isolamento viral convencionais, sendo adequado para testes de atestado e diagnóstico de rotina (RADOSTITS et al, 2002). As técnicas de anticorpo monoclonal também são usadas para detectar o antígeno viral no sistema nervoso central dos bovinos PI.

Os kits comerciais são usuais na detecção de animais PI, e não são confiáveis no diagnóstico de infecção aguda por BVDV (SALIKI & DUBOVI, 2004). O teste de ELISA é usado em amostras leite, para mensurar a prevalência das vacas positivas ao anticorpo contra BVDV nos rebanhos leiteiros (RADOSTITS et al, 2002).

O teste de ELISA pode ser aplicado também em cortes de orelha não fixadas em formalina (SALIKI & DUBOVI, 2004; CORNISH, T.E., 2005).

#### 2.6.3 Detecção dos ácidos nucleicos

Em geral, os ácidos nucleicos virais podem ser detectados diretamente de amostras animais ou podem ser amplificados por PCR (SALIKI & DUBOVI, 2004). Os métodos de detecção dos ácidos nucleicos do RNA do genoma viral apresentam vantagens sobre o isolamento viral por falta de interferência potencial com anticorpo neutralizante bem como sua sensibilidade e especificidade (RADOSTITS et al, 2002).

### 2.6.3.1 PCR

A técnica de PCR é capaz de detectar pequenas quantidades de ácido nucléico viral de amostras de sangue e tecidos, incluindo material conservado (RADOSTITS et al, 2002). Fatores, como custo, perícia técnica, equipamento e automatização e métodos de extração do RNA, são considerados na comparação com os métodos padrões de isolamento viral (RADOSTITS et al, 2002). O PCR é um método muito sensível (RADOSTITS et al, 2002; BRODERSEN, 2004), mas é sujeito a falsos positivos devido a contaminações da amostras no momento da coleta ou no laboratório (BRODERSEN, 2004). Ensaio de amplificação por PCR é usado em amostras volumosas de leite, para identificar rebanhos leiteiros com infecção pelo BVDV (RADOSTITS et al, 2002), e é também efetivo na detecção de bovinos PI (BRODERSEN, 2004).

### 2.6.4 Sorologia

As técnicas sorológicas são usadas para detectar e mensurar os anticorpos (RADOSTITS et al, 2002). O teste de neutralização sérica (NS) é o teste padrão para determinar a ocorrência de um título para o BVDV (RADOSTITS et al, 2002). O título de anticorpos pode variar muito entre os laboratórios conforme a cepa viral e as células utilizadas no teste (RADOSTITS et al, 2002; SALIKI & DUBOVI, 2004).

Após a infecção aguda, o anticorpo sérico é primeiramente detectável em duas a três semanas, e os níveis de picos do anticorpo ocorrem oito a 10 semanas mais tarde. Após vacinação bem sucedida, os títulos NS ficam altos por muitos meses (RADOSTITS et al, 2002).

Os animais PI são soronegativos, exceto se tiverem anticorpo colostrar nas primeiras semanas após nascimento (RADOSTITS et al, 2002). Os anticorpos geralmente não são detectáveis no soro da maioria dos bovinos com doença da mucosa (RADOSTITS et al, 2002). A tolerância imune específica do vírus persistente também não será rompida pelo vírus citopático, se ele for antigenicamente similar ou idêntico ao vírus persistente, resultado da doença das mucosas fatal (RADOSTITS et al, 2002). Os bovinos PI expostos a outros isolamentos dos vírus citopáticos que não induzem imediatamente a doença das mucosas podem produzir anticorpos neutralizantes séricos altamente específicos (RADOSTITS et al, 2002).

O soro pré colostrar dos bezerros infectados *in útero* como fetos imunocompetentes podem ter anticorpos neutralizantes específicos para o vírus, e sua demonstração é

significativa para diagnóstico de infecção passada (RADOSTITS et al, 2002). Um teste de neutralização sérica com uma incubação curta de três dias é atualmente disponível, sendo um progresso sobre o teste de cinco dias (RADOSTITS et al, 2002).

Deve-se tomar cuidado com interpretação dos resultados na ausência do histórico. Quando corretamente aplicado, o teste sorológico pode ser utilizado para testar a eficácia da vacina, avaliar a confiança do protocolo de vacinação, conferir o estado do rebanho frente à exposição do BVDV e associar o BVDV com sinais clínicos (SALIKI & DUBOVI, 2004).

## **2.7 Diagnóstico diferencial**

O BVDV deve ser diferenciado de etiologias que causam diarreia, erosões e/ou ulcerações no trato gastrointestinal, falha reprodutiva, teratologia, doenças de pele, subdesenvolvimento e doença respiratória. As causas desses incluem diversos agentes infecciosos, parasitas e toxinas. As mais frequentes são a febre catarral maligna, doença da língua azul (embora não exista relato de doença clínica no Brasil), rinotraqueite infecciosa bovina, salmonelose, febre aftosa, coccidiose e helmintoses (POTGIETER, 2004).

A prevalência e epidemiologia dessas doenças em diferentes países devem ser levadas em conta no diagnóstico. Por exemplo, a febre aftosa ocorre em alguns países, como no Brasil, porém geralmente é caracterizada por baixa mortalidade, ausência de diarreia e rápida disseminação. Febre catarral maligna normalmente está associada com vasculite generalizada (BARKER et al, 1993) e com a presença de certos ungulados, como por exemplo, ovelhas, e tem alta mortalidade (POTGIETER, 2004).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Procedimentos gerais

Foram avaliados na imunoistoquímica (IHQ) e na histologia tecidos de 19 bovinos suspeitos clinicamente de infecção pelo BVDV ou de outras enfermidades que podem ser confundidas com BVDV e casos com sinais clínicos e lesões sugestivas de BVDV sem registro de suspeita clínica, constantes nos arquivos do Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre janeiro 1996 e dezembro 2003. Foram avaliados também 161 fetos bovinos abortados recebidos entre junho 1999 e maio 2004.

Foram avaliados pela necropsia dois bovinos suspeitos clinicamente de infecção pelo BVDV acompanhados entre 2004 e 2005.

Doze biópsias de tecido cutâneo da orelha de bovinos suspeitos clinicamente e 642 biópsias de propriedades que efetuam monitoramento da infecção pelo BVDV, remetidos ao SPV entre janeiro de 2004 e agosto de 2005 foram submetidos à IHQ.

O número total de necropsias de bovinos efetuadas no período de janeiro de 1996 até agosto 2005 foi obtido de arquivos e registros do SPV-UFRGS.

#### 3.2 Sinais clínicos

Nos casos positivos na IHQ para BVDV, do período entre 1996 e 2003, os sinais clínicos foram obtidos nos registros do SPV-UFRGS. Os casos de infecção por BVDV ocorridos entre 2004 e 2005 foram avaliados na ocasião da necropsia.

#### 3.2 Análise *post mortem*

Os achados *post mortem* dos animais reavaliados (1996-2003), positivos para BVDV na IHQ, foram coletadas dos registros do SPV-UFRGS.

Os animais positivos para BVDV nas biópsias de tecido cutâneo da orelha na IHQ e suspeitos clinicamente da doença no período entre 2004 e 2005 foram eutanasiados com solução comercial de embutramida, tetracaína cloridrato e mebezonio ioduro (T61®) e necropsiados. Durante a necropsia, foram coletados encéfalo e fragmentos de pulmão, coração, fígado, pâncreas, rúmen, retículo, omaso, abomaso, intestino, rim, linfonodos e timo, fixados em formalina 10%.

### 3.3 Análise histológica

Os fragmentos de diversos tecidos fixados em formalina 10% procedentes da necropsia foram processados em no máximo 48 horas após a coleta, embebidos em parafina e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET et al, 1992) para exame histopatológico.

Nos casos ocorridos entre 1996 e 2003 foram avaliados apenas os tecidos disponíveis em blocos de parafina coletados na ocasião da necropsia, portanto os tempos de fixação em formalina antes do processamento e inclusão em parafina não são conhecidos.

### 3.4 Imunoistoquímica (IHQ)

A IHQ foi realizada em cortes, embebidos em parafina, de córtex, cerebelo, tronco encefálico, pulmão, coração, fígado, pâncreas, rúmen, retículo, omaso, abomaso, intestino, rim, osso, linfonodos e timo dos animais necropsiados e reavaliados (quando disponíveis) e em biópsias de tecido cutâneo da orelha dos animais suspeitos clinicamente. A IHQ foi baseada na descrição de Haines et al (1992). Foi realizada empregando-se um kit comercial (DAKO, USA) contendo um anticorpo secundário biotinalado e um complexo de avidina conjugada com peroxidase. O anticorpo primário monoclonal comercial anti-BVDV 15C5 (Syracuse, USA) foi diluído em uma solução tampão fosfato na concentração de 1:500.

Após desparafinar as lâminas em xilol, hidratar em álcool em concentrações decrescentes e lavar em água destilada, foi aplicada uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos para a realização do bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi feita com protease 0,05% por 15 minutos a 37°C e as marcações inespecíficas (background) foram reduzidas a partir da aplicação de leite desnatado a 5% por 15 minutos. O anticorpo primário foi aplicado durante 50 minutos a uma temperatura de 37°C, seguido do anticorpo secundário biotinalado e solução da avidina conjugada com peroxidase por aproximadamente 20 minutos cada, a temperatura ambiente. A revelação da marcação foi obtida através da utilização do cromógeno *NovaRED* (Vector Laboratories, USA), por 5 a 10 minutos. Foi empregada hematoxilina como contra-corante, por aproximadamente 1 minuto. As lâminas foram lavadas com solução de TBS (tris buffer saline) pH 7.0 após cada passo da técnica. Lâminas controle positivo de timo e biópsia de pele foram inseridas junto com as lâminas a serem testadas. Em alguns casos foram feitos controles negativos substituindo apenas o anticorpo primário por solução de PBS (buffer saline).

Na IHQ dos fetos foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (Dako, USA) e como cromógeno o *Permanent Red* (DakoCytomation, USA).

### **3.5 Isolamento viral.**

Sangue e fragmentos de pulmão, baço e linfonodos dos bovinos necropsiados entre 2004 e 2005 foram coletados, refrigerados e enviados ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria, sob responsabilidade do professor Eduardo Furtado Flores, para isolamento viral.

Os resultados do isolamento viral dos casos ocorridos entre 1996 e 2003 foram obtidos nos registros dos arquivos do SPV-UFRGS.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Procedimentos gerais

A raça, sexo, idade e sinais clínicos dos dezenove bovinos com suspeita clínica de BVDV ou de outras enfermidades, que podem ser confundidas com BVDV, ou ainda nos casos em que não havia registro da suspeita, porém os sinais clínicos e lesões eram sugestivos da doença, estão descritos na tabela 1.

Desses dezenove casos reavaliados, quatro foram positivos para BVDV na IHQ.

Tabela 1. Bovinos avaliados de 1996 a 2003. Raça, idade, sexo, suspeita clínica e sinais clínicos.

<i>Raça</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Suspeita</i>	<i>Sinais clínicos</i>
HPB <sup>(1)</sup>	4 anos	Macho	BRSV	Emagrecimento progressivo. Sinais respiratórios
HPB		Macho	BRSV	Emagrecimento. Sinais respiratórios.
Jersey	5 meses	Fêmea	NR <sup>(2)</sup>	Defeitos congênitos
HPB*	18 meses	Fêmea	NR	Emagrecimento. Diarréia. Lesões crostosas nas narinas e erosões gengiva
HPB*	8 meses	Fêmea	BVDV	Febre e diarréia profusa, acentuada, refratária ao tratamento. Evolução de uma semana.
HPB	14 dias	Macho	Manejo com colostro	Diarréia. Aftas na cavidade oral
Red Angus	2 anos	Fêmea	BVDV	NR
Red Angus	3 dias	Fêmea	BVDV	Hidrocefalia e nanismo.
HPB	1,5 anos	Fêmea	NR	Morte súbita.
HPB	7 dias	Fêmea	BVDV	NR
Nelore	6 meses	Macho	NR	Propriedade com alto índice de aborto
HPB	1 ano	Fêmea	BVDV	NR
Pardo suíço*	3 meses	Fêmea	NR	Emagrecimento progressivo e diarréia.
HPB	1 mês	Macho	BVDV	NR
Hereford*	3 anos	Fêmea	NR	Emagrecimento. Inapetência.
HPB	4 anos	Macho	BVDV	Apatia. Diarréia crônica.
HPB	14 meses	Fêmea	BVDV	Baixo desenvolvimento corporal. Diarréia intermitente, refratária ao tratamento.
Mista	3 anos	Fêmea	Intoxicação	Emagrecimento progressivo. Diarréia sanguinolenta. Petéquias na mucosa vaginal.
Devon	30 dias	Fêmea	BVDV	Prostração. Diarréia amarelada e posteriormente enegrecida

<sup>1</sup>HPB: Holandesa <sup>2</sup>NR: Não registrado \* Casos positivos para BVDV na IHQ



Das 12 biópsias de tecido cutâneo da orelha de bovinos suspeitos clinicamente de infecção pelo BVDV duas apresentaram marcação positiva na IHQ. As 642 biópsias de tecido cutâneo de bovinos procedentes de propriedades que efetuam monitoramento da doença resultaram em marcação negativa na IHQ.

Foram avaliados pela IHQ 161 fetos bovinos abortados. Desses, três foram positivos.

Em 2004 foram necropsiados dois animais com suspeita clínica de BVDV, ambos com diarreia e emagrecimento progressivo, sendo apenas um deles confirmado na IHQ.

No total, seis bovinos e três fetos bovinos abortados foram positivos para BVDV, e os sinais clínicos, achados de necropsia, histologia e IHQ estão descritos a seguir.

#### 4.2 Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados nos bovinos infectados foram diarreia crônica (5/6) e emagrecimento progressivo (4/6). A apresentação da diarreia era variada, incluindo diarreia catarral, muco-sanguinolenta (Figura 1), e aquosa em arco (Figura 2). Prostração (1/6), inapetência (1/6), febre (2/6), baixo desenvolvimento em relação a animais da mesma idade (2/6) e erosões na cavidade oral (2/6) e narinas (2/6) (Figura 4) também foram observados. A raça, idade, sexo e sinais clínicos dos bovinos positivos para o BVDV estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Casos positivos para infecção pelo vírus da diarreia viral bovina. Raça, ano que ocorreu o caso, idade, sexo e sinais clínicos.

<i>Bovino</i>	<i>Ano</i>	<i>Raça</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Sinais clínicos</i>
1	1996	HPB	18 meses	Fêmea	Emagrecimento, lesões crostosas nas narinas e erosões na gengiva, diarreia.
2	1999	HPB	8 meses	Fêmea	Febre e diarreia profusa, acentuada, refratária ao tratamento.
3	2002	Pardo Suíço	3 meses	Fêmea	Emagrecimento progressivo, subdesenvolvimento, lesões crostosas nas narinas, diarreia.
4	2002	Hereford	3 anos	Fêmea	Emagrecimento, inapetência.
5	2004	Mista	2 anos	Macho	Prostração e febre, tenesmo e diarreia muco-sanguinolenta crônica.
6	2005	Pardo Suíço	1,5 anos	Macho	Emagrecimento progressivo, subdesenvolvimento, erosões na cavidade oral, diarreia crônica em arco, refratária ao tratamento.



Figura 1. BVDV. Sinais clínicos. Bovino 5. Diarréia crônica sanguinolenta.



Figura 2. BVDV. Sinais clínicos. Bovino 6. Diarréia aquosa em arco. Subdesenvolvimento.



Figura 3. BVDV. Sinais clínicos. Bovino 3. Lesões crostosas na narina.

### 4.3 Achados de necropsia

À necropsia foram observadas freqüentemente erosões e ulcerações no trato digestivo, localizadas na gengiva (2/6), base da língua (2/6) (Figura 4), esôfago (3/6), rúmen (1/6), transição retículo-omaso (2/6), omaso (1/6) (Figura 5), abomaso (2/6) e intestino (2/6) (Figura 6). A presença de conteúdo fibrinóide e catarral no intestino delgado (Figura 7), assim como evidênciação e necrose das placas de Peyer (Figura 8) e lesões na mucosa intestinal também foram achados freqüentes. Atrofia de timo (2/5), linfadenomegalia (2/6) e pododermatite interdigital (2/6) (Figura 9) foram observadas. Os achados macroscópicos observados nos seis bovinos infectados pelo BVDV estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3.** Achados macroscópicos observados nos bovinos com BVDV, diagnosticados no Setor de Patologia da UFRGS.

<i>Bovino</i>	<i>Achados macroscópicos</i>
1	Pododermatite interdigital (MPD). Crosta nas narinas e erosões no palato, gengiva e base da língua. Erosões com placas necróticas esbranquiçadas ao longo do esôfago. Área necrótica na zona de transição retículo omaso. Pulmão com pneumonia antero-ventral. Linfadenomegalia.
2	Baço com hiperplasia linfóide. Ulcerações de 2mm na região pilórica abomaso. Íleo com estruturas cilíndricas friáveis. Ceco e cólon com conteúdo enegrecido.
3	Pododermatite interdigital. Timo atrofiado Ulcerações língua e esôfago de tamanho variado. Ulcerações no omaso e abomaso.
4	Ulcerações na mucosa oral, esôfago e rúmen.
5	Jejuno e íleo: conteúdo fibrinóide adjacente às placas de Peyer, algumas com necrose. Edema de serosa. Intestino grosso: fissuras 2 cm na mucosa e moldes de fibrina.
6	Timo atrofiado. Linfadenomegalia. Intestino evidênciação das placas de Peyer, conteúdo líquido com restos de fibrina. Reto com erosões de 1 cm na mucosa.

MPD. Membro posterior direito.



Figura 4. BVDV. Bovino 3. Ulceração focal na base da língua.



Figura 5. BVDV. Bovino 3. Omaso. Área de erosão na mucosa.



Figura 6. BVDV. Bovino 5. Intestino grosso. Fissuras multifocais na mucosa intestinal.

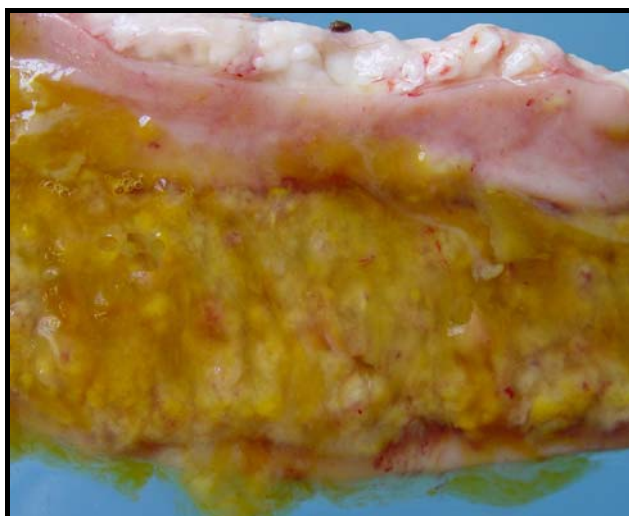


Figura 7. BVDV. Bovino 5. Intestino delgado. Presença de exsudato fibrinonecrótico aderido às placas de Peyer.



Figura 8. BVDV. Bovino 6. Intestino delgado. Evidenciação da placa de Peyer.

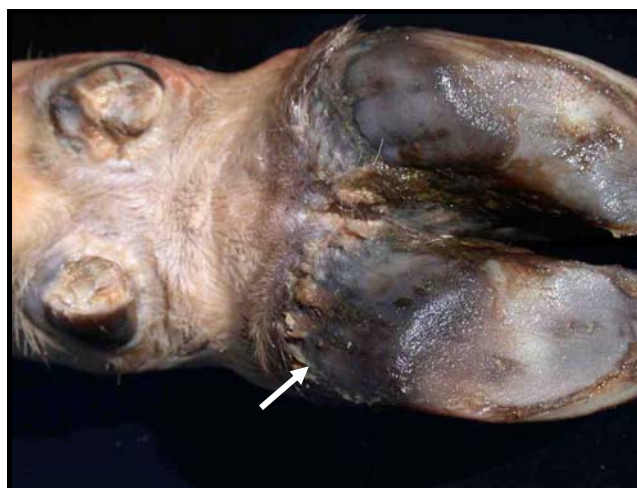


Figura 9. BVDV. Bovino 3. Membro posterior direito com pododermatite. Fissuras na banda coronária (seta).



#### 4.4 Histologia

Histologicamente, no intestino delgado, as lesões foram observadas principalmente nas vilosidades e caracterizavam-se por enterite. Essa enterite era mononuclear difusa de intensidade variada (5/6), acompanhada, em alguns casos por infiltrado eosinofílico (2/6) e neutrofílico (2/6), necrose de vilosidades discreta a acentuada (3/5), necrose de células das criptas (Figura 10) (2/6), e vasculite e degeneração fibrinóide acentuada difusa na parede de vasos (1/6). Hiperplasia linfóide (2/6) e necrose de placas de Peyer (1/6) também foram observadas. Em um caso havia áreas multifocais de necrose das vilosidades acompanhadas de hemorragia moderada no intestino grosso. As enterites foram classificadas como enterite fibrinonecróticas (bovino 6), necro-fibrino-supurativa (bovino 5), mononuclear (bovinos 1, 2 e 3) e abscedativa (bovino 4).

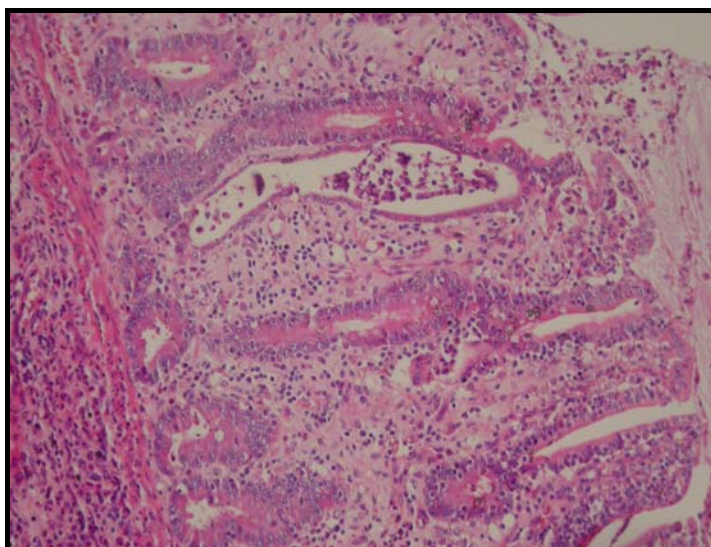


Figura 10. BVDV. Bovino 5. Intestino delgado. Enterite mista difusa acentuada com depósitos de fibrina na mucosa. Necrose de epitélio de cripta. HE, obj. 10

Nos linfonodos foram observadas hiperplasia dos folículos linfóides (1/5), perda difusa da estrutura folicular (3/5), edema periférico(3/5) e infiltrado mononuclear moderado (1/5). No baço foi observado hiperplasia linfóide (5/5) e em um caso necrose dos centros foliculares.

Foram observadas lesões histológicas no cérebro de três bovinos. Gliose difusa com hipertrofia do endotélio vascular multifocal, cromatólise e neuroniofagia multifocal moderada na região do hipocampo e mesencéfalo foram observadas no bovino 1. No bovino 6 as lesões eram mais leves e se caracterizavam por encefalite mononuclear focal discreta e vasculite mononuclear multifocal discreta. Neuroniofagia e gliose difusa foram observadas no bovino 3.

As lesões histológicas do rim se caracterizavam por dilatação tubular multifocal moderada (2/5) e proteinúria multifocal discreta (2/5), degeneração hidrópica multifocal moderada na cortical (1/5) e nefrite intersticial mononuclear discreta a moderada (3/5).

#### 4.5 Fetos bovinos

Os três fetos positivos para BVDV, foram abortados com 8 meses de idade. Um feto apresentava focos de hemorragia no pulmão e sufusões na mucosa oral, bexiga, rúmen e abomaso. Histologicamente apresentava hemorragia focalmente extensa no pulmão e rúmen e depleção linfóide no timo. Em outro caso, foi observada uma cavidade cística na substância branca do cérebro (porencefalia) (Figura 11). Histologicamente havia depleção dos folículos linfóides no baço.

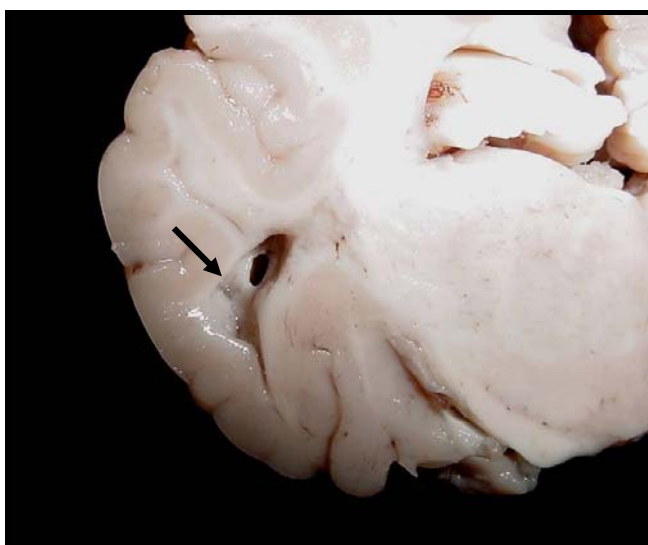


Figura 11. BVDV. Feto bovino. Cérebro. Cavidade cística na substância branca (Seta) (Porencefalia).

#### 4.6 Imunoistoquímica

A marcação positiva dos fragmentos cutâneos testados foi caracterizada por marcação finamente granular vermelha no citoplasma das células dos folículos pilosos e nas células endoteliais (Figura 12).

A distribuição das marcações positivas nos órgãos submetidos à técnica de IHQ dos seis animais positivos apresentam-se na tabela 4.

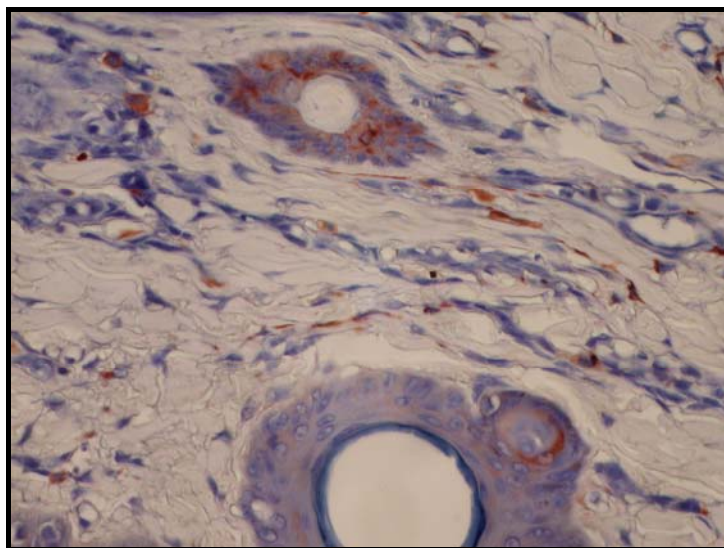


Figura 12. BVDV. Bovino 6. Tecido cutâneo (orelha). Marcação positiva (vermelha) nas células epiteliais dos folículos pilosos e células endoteliais. IHQ, obj. 40



**Tabela 4.** Distribuição do antígeno do BVDV nos tecidos de seis bovinos com BVDV.

Tecido	Tipo celular marcado	Bovinos analisados					
		1	2	3	4	5	6
Pele	Epitélio folicular, queratinócitos, células endoteliais e mononucleares	-	-	1	1	1	1
Osso	-	-	-	0	-	0	0
Cérebro	Neurônios, células endoteliais	1	1	1	0	0	1
Cerebelo	Neurônios, células endoteliais	1	-	1	0	0	1
Tronco encefálico	Neurônios	1	-	0	1	0	0
Intestino delgado	Células mononucleares lâmina própria, células epiteliais das criptas	1	1	0	0	1	0
Linfonodo	Linfócitos e histiócitos	0	-	1	0	1	1
Baço	Células foliculares e histiócitos	0	1	1	-	1	1
Pulmão	Células epiteliais bronquiolares	1	-	0	1	0	1
Fígado	-	0	0	0	0	0	0
Rim	Células epiteliais tubulares	0	1	0	0	1	0
Língua	-	0	-	0	0	-	-
Esôfago	Queratinócitos e células mononucleares	1	-	0	0	-	-
Omaso	Células epiteliais	-	0	1	-	0	0
Glândula	Células acinares	1	-	-	-	-	-
Pâncreas	Células acinares	-	-	-	-	-	1
Treóide	Células foliculares	-	-	1	-	-	0

0: marcação negativa; 1: marcação positiva; -: não analisado.

No pulmão o antígeno do BVDV foi observado no citoplasma das células epiteliais bronquiolares morfológicamente normais e ocasionalmente nas células mononucleares intersticiais e macrófagos alveolares. No cérebro, a marcação positiva se caracterizou por coloração vermelha do citoplasma de neurônios (Figuras 13 e 14), principalmente do córtex e hipocampo. No cerebelo o antígeno foi observado no citoplasma de neurônios da camada granular, células de Purkinje e células da glia (Figura 15).

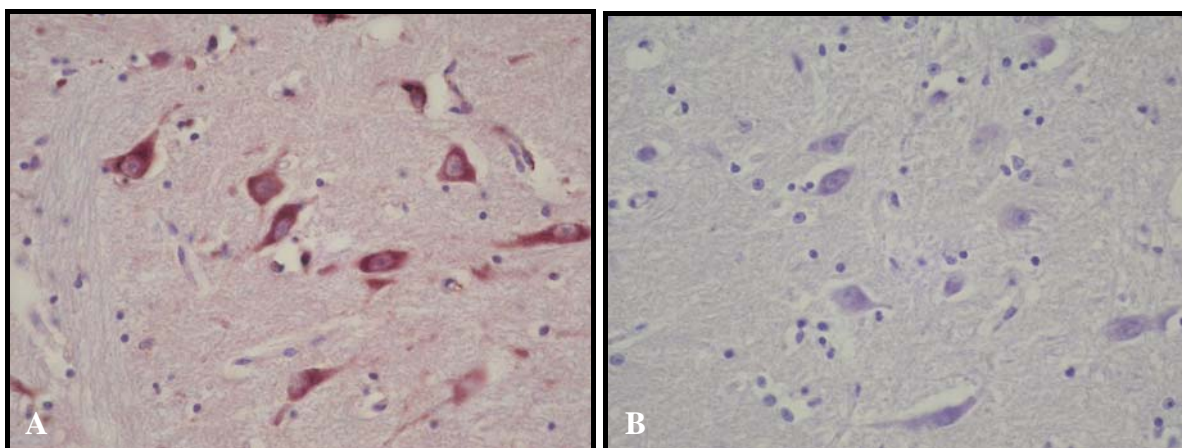


Figura 13. BVDV. Bovino 2. Cérebro. Córtex cerebral. Marcação positiva acentuada no citoplasma de neurônios (A). Controle negativo (B). IHQ, obj. 40

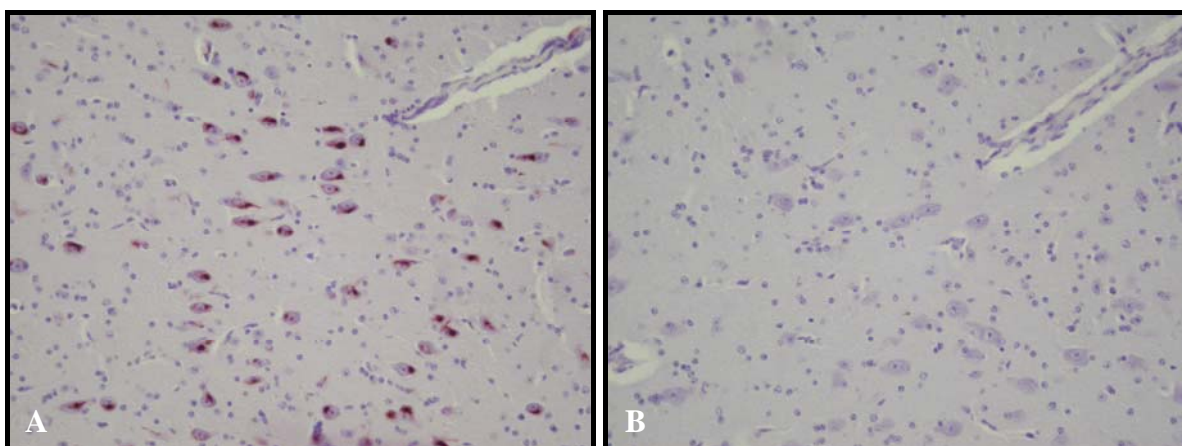


Figura 14. BVDV. Bovino 3. Cérebro. Córtex cerebral. Marcação positiva (vermelha) acentuada difusa no citoplasma de neurônios (células piramidais) (A). Controle negativo (B). IHQ, obj. 20

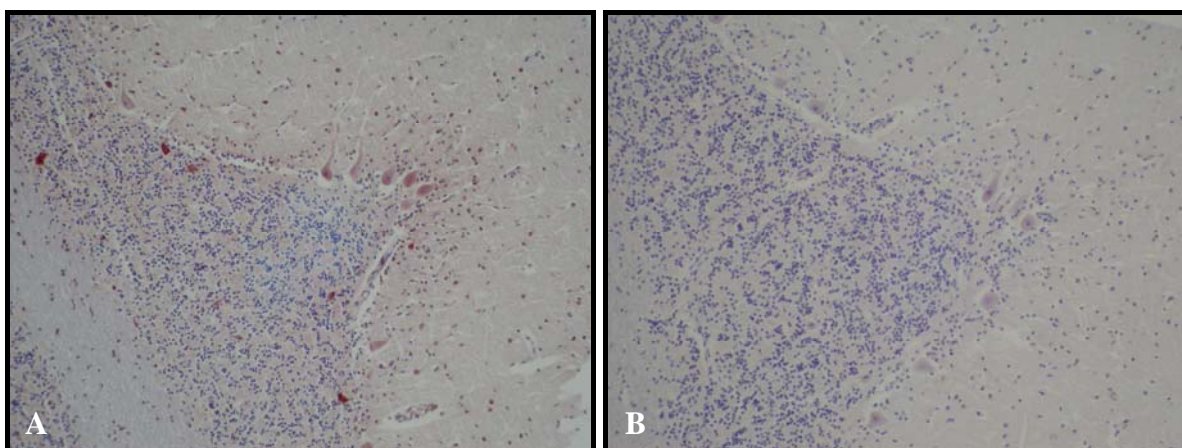


Figura 15. BVDV. Bovino 1. Cerebelo. Marcação positiva multifocal moderada no citoplasma de neurônios da camada granular e das células de Purkinje (A). Controle negativo (B). IHQ, obj.10

No intestino observou-se marcação nas células mononucleares da lâmina própria e vilosidades, e no citoplasma de enterócitos das criptas (Figura 16) e vilosidades. No rim a marcação positiva foi observada nas células epiteliais dos túbulos da zona medular (Figura 17).

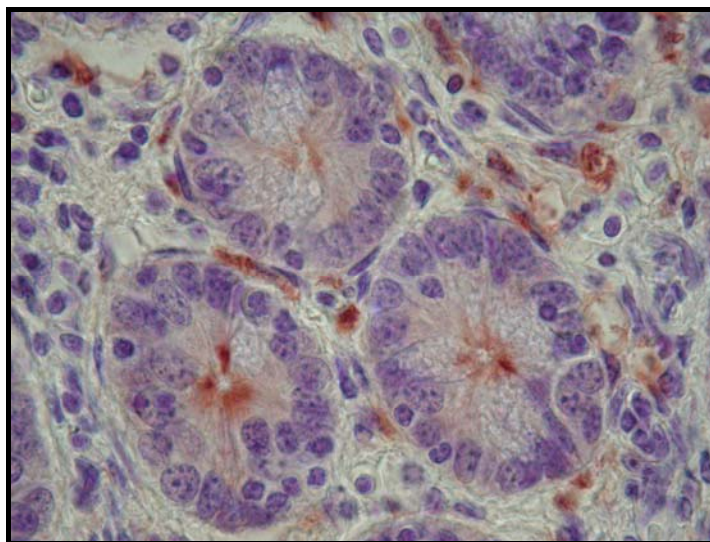


Figura 16. BVDV. Bovino 1. Intestino delgado. Marcação positiva vermelha no ápice de enterócitos das criptas intestinais e nas células mononucleares da lâmina própria. IHQ, obj. 100

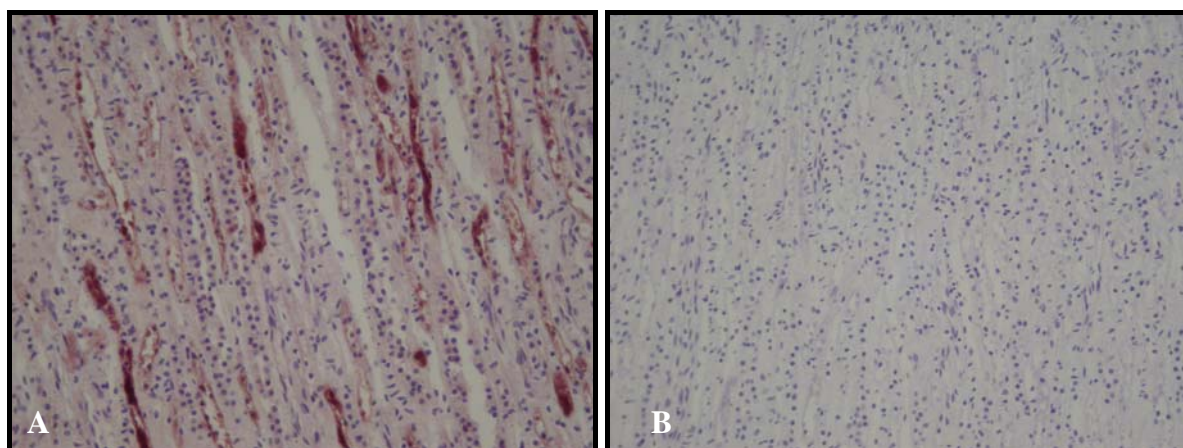


Figura 17. BVDV. Bovino 2. Rim. Marcação positiva multifocal acentuada nos túbulos medulares retos da zona medular (A). Controle negativo (B). IHQ, obj. 20



Na IHQ dos fetos foram constatadas marcações positivas na mucosa ruminal e folículos pilosos em um caso e células endoteliais do cérebro (Figura 18) de outro. Intensa marcação positiva no timo (Figura 19) e células de Kupffer em dois casos também foram observados.

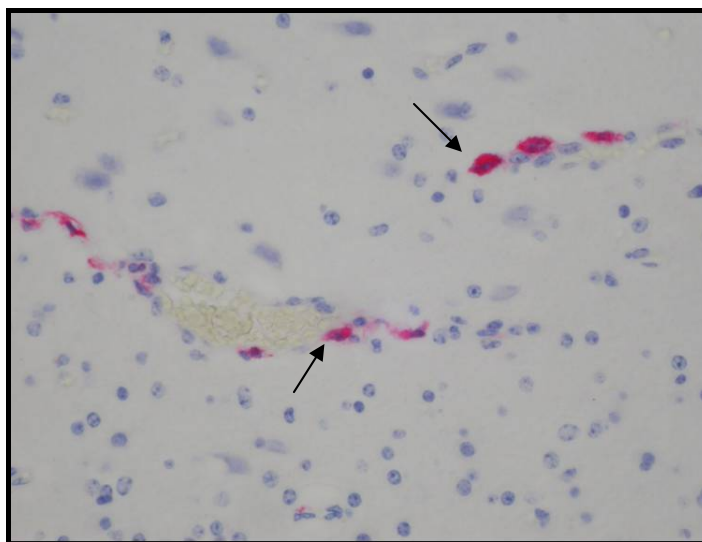


Figura 18. BVDV. Feto bovino. Córtex cerebral. Marcação positiva para BVDV nas células endoteliais (setas). IHQ, obj. 40

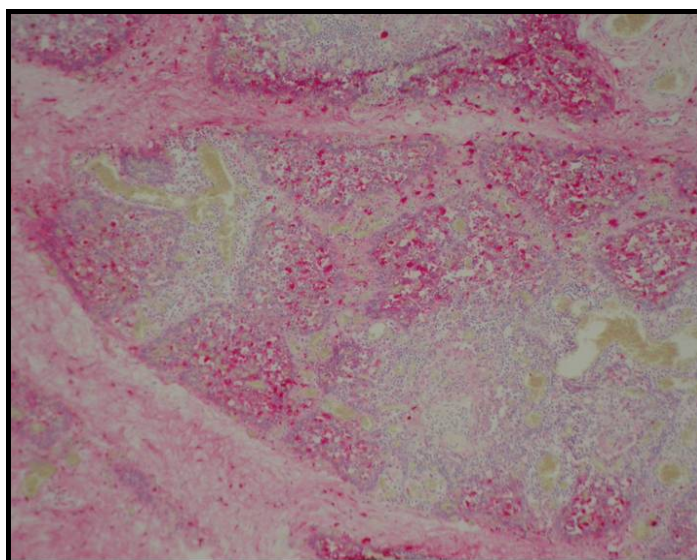


Figura 19. BVDV. Feto bovino. Timo. Marcação positiva acentuada para BVDV. IHQ, obj. 10

#### **4.7 Isolamento viral**

Foi isolado BVDV tipo 2 NCP de leucócitos do bovino 1, e de macerados de tecidos e leucócitos, BVDV tipo 1 NCP no bovino 3 e 6 e CP/NCP no bovino 5.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo apontou 6 casos (1,08%) de infecção por BVDV, confirmados pela imunoistoquímica (IHQ), entre 553 bovinos remetidos ao Setor de Patologia da UFRGS, no período entre janeiro 1996 e agosto 2005. De acordo com a literatura a incidência da doença é variada (RADOSTITS, 2002). Oliveira et al (1996) detectaram 1-2% (12/1240) amostras positivas para o vírus em rebanhos com problemas reprodutivos no RS. Eduardo Flores et al (2005) isolaram e caracterizaram 46 amostras do vírus no período entre 1996 e 2004, entre elas, amostras dos bovinos 1,3 e 5 deste trabalho. Embora aparentemente baixa, a prevalência de animais virêmicos observada em diversos estudos é suficiente para manter o vírus na população (BAKER, 1995). De acordo com Samara et al (2004) na região sul do Estado de Minas Gerais a ocorrência de animais reagentes foi de 57,56% e na região nordeste do Estado de São Paulo foi de 56,49%.

De 161 fetos examinados na IHQ, três foram positivos (1,12%), número considerado baixo. Dados publicados referentes ao BVDV como etiologia de casos de aborto a consideram baixa, variando entre 2 e 7 % (BOTTON et al, 1998; POTGIETER, 2004).

A IHQ utilizando o anticorpo monoclonal 15C5 se mostrou uma forma sensível para diagnosticar a infecção pelo BVDV nesse estudo. De acordo com publicações existe uma concordância de 97,6% entre isolamento viral e a IHQ em biópsias de pele fixadas em formalina (LERTORA et al, 2003). A IHQ, no entanto, é mais rápida e garante informações adicionais a respeito da associação entre a localização do vírus e lesões teciduais (BASZLER et al, 1995; CORNISH et al, 2005). Além disso, as amostras fixadas são mais estáveis que amostras de sangue, evitando falsos negativos por autólise e permitindo diferenciar bovinos PI e pode ser utilizada em neonatos sem interferência dos anticorpos colostrais (NJAA et al, 2000) e em tecidos fetais fixados em formalina (RADOSTITS et al, 2002).

Entre as biópsias de pele dos animais infectados pelo vírus testadas, todas foram positivas na imunoistoquímica, demonstrando que a biópsia de tecido cutâneo (orelha) fixada em formol é considerada um tecido de escolha para diagnóstico do BVDV pela IHQ, sendo um método efetivo para detecção de bovinos infectados pelo BVDV, e eficiente técnica para diagnóstico de animais PI como já descrito em publicações anteriores (NJAA et al, 2000; GROOMS & KEILEN, 2002; LERTORA et al, 2003; BRODERSEN, 2004; CORNISH et al, 2005). Além de eficiente a técnica permite testar um grande número de

bovinos, com rapidez e com tecido de fácil coleta (CORNISH et al, 2005). Em experimentos com inoculação em animais imunocompetentes durante a viremia a detecção de antígeno viral por IHQ se restringe as porções de epitélio que não pertencem ao folículo piloso, ao contrário de animais persistentemente infectados, onde o antígeno é detectado de forma sistemática em folículos pilosos (NJAA et al, 2000). No presente trabalho, em animais positivos na IHQ, o antígeno estava presente principalmente em folículos pilosos e em outras porções do epitélio, como tecido endotelial, queratinócitos e em células mononucleares, demonstrando a presença de animais PI entre os casos diagnosticados.

O BVDV foi identificado na IHQ no cérebro de quatro bovinos do total de seis analisados (66,66%), indicando ser um dos órgãos de escolha para a realização da IHQ. A marcação positiva foi observada principalmente no citoplasma de neurônios do córtex nas camadas de células piramidais superiores e inferiores do córtex cerebral. A ocorrência de marcação positiva no cérebro já foi relatada (WOHRMANN et al, 1992; MARSHALL, MOXLEY & KELLING, 1996). No cerebelo, a marcação positiva foi encontrada nas células granulares, no citoplasma de algumas células de Purkinje, assim como nos seus prolongamentos dendríticos. De acordo com estudo de Wohrmann et al (1992) e Fernandez et al (1989), os neurônios podem ter um receptor específico para o BVDV, o que explicaria seu tropismo por células nervosas. É sabido que o BVDV atravessa a barreira encefálica nos fetos virêmicos (WOHRMANN et al, 1992), o que é comprovado pela marcação positiva nas células endoteliais observada no cérebro do feto número 2, assim como nos bovinos 2 e 3 (cerebelo). Deve-se levar em conta que a infecção dos neurônios não causa necessariamente destruição ou lesão celular (FERNANDEZ et al, 1989; WOHRMANN et al, 1992).

Um caso apresentou marcações positivas no tecido epitelial da tireóide, mas não havia evidências de lesões celulares, como descrito por Anderson et al, 1987 e Larsson et al, 1995. Esse animal apresentava retardo no crescimento quando comparado a animais de mesma idade, possivelmente a replicação do vírus nas células foliculares da glândula tireóide podem interferir na síntese ou secreção dos hormônios tireoidianos, e então afetar o desenvolvimento do sistema esquelético, causando um retardo do crescimento (LARSSON et al, 1995). Belak et al (1989) testou na imunoistoquímica quatro tireóides de animais PI e em apenas duas foi encontrado antígeno. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de que o retardo de crescimento e o nível menor de hormônios tireoidianos em bovinos persistentemente infectados sejam efeito de infecções secundárias inaparentes e diminuição

da alimentação, uma vez que esses fatores podem reduzir os níveis desses hormônios (LARSSON et al, 1995).

A distribuição do antígeno viral nos tecidos com ausência de lesões foi observada em alguns bovinos, independentemente da forma clínica da doença. Como nem todos os órgãos de bovinos foram examinados na IHQ nesse estudo, não foi possível determinar precisamente onde a difusão da infecção viral foi mais prevalente nas diferentes formas clínicas da doença dos bovinos examinados.

A fixação de tecidos em formalina por longos períodos pode mascarar a detecção de antígenos, e mesmo utilizando métodos como enzimas ou calor para recuperação antigênica, isso pode ser um obstáculo para marcação positiva do antígeno (SHI et al., 1997). Alguns materiais suspeitos de BVDV reavaliados estavam disponíveis apenas em blocos de parafina, é provável, portanto, que alguns casos tenham resultado em falsos negativos, como diversos tecidos foram reavaliados essa possibilidade é pequena.

No isolamento foi identificado BVDV tipo 2 em um caso. Esse bovino apresentou sinais clínicos como emagrecimento, lesões crostosas nas narinas e erosões na gengiva e diarreia. Ulcerações na gengiva, base da língua, ao longo do esôfago e zona de transição retículo omaso e edema pulmonar foram observados na necropsia. Brum et al (2002), reproduziram a doença experimentalmente com o BVDV tipo 2 em bezerros de 45-60 dias de idade, com isolados de dois bovinos, um deles de isolados do bovino 1 deste trabalho (FLORES et al, 2005). Os bovinos inoculados experimentalmente apresentaram sinais clínicos e lesões macroscópicas semelhantes aos relatados no bovino 1, porém foram observadas também equimoses e sufusões no baço, rúmen, intestino delgado e ceco (BRUM et al, 2002). O isolamento do BVDV tipo 2 normalmente está associado à diarreia viral bovina severa ou síndrome hemorrágica (BOLIN & GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004), a qual é caracterizada, além de ulcerações orais, posteriormente, por diarreia sanguinolenta e hemorragias petequiais equimóticas difusas (POTGIETER, 2004).

Em três bovinos foi isolado BVDV do biotipo NCP, se tratando de animais PI. Em um desses bovinos, além do biotipo NCP, foi isolado também o biotipo CP, associado à doença das mucosas (DM). Esse animal apresentou enterite fibrino-necrótica, edema de serosa e necrose das placas de Peyer no intestino e delgado e fissuras na mucosa do cólon proximal, lesões semelhantes às encontradas na DM aguda como descritas por Bielefeldt-Ohmann (1995), Liebler-Tenório (2000) e Potgieter (2004). O exame macroscópico revela diferenças sutis entre as formas aguda e crônica da doença e histologicamente existe



similaridade de lesões com distribuição variável (TENÓRIO et al, 2000), portanto a diferenciação entre as duas formas individualmente apenas pelos exames macroscópicos e histológicos é muito difícil (CARMAN et al, 1998).

As lesões encontradas nos fetos não são características apenas da infecção pelo BVDV. Fetos com infecção transplacentária durante o segundo trimestre de gestação (entre 100 e 150 dias) pode resultar em destruição das células tronco, resultando em defeitos congênitos (BAKER, 1987). Foi encontrada porencefalia em um dos fetos examinados com marcação positiva na IHQ do cérebro. A porencefalia consiste em formação de cavidades no cérebro, que geralmente se comunicam com os ventrículos ou espaço subaracnóideo. Podem ser únicas ou múltiplas. (SUMMERS et al, 1995). A patogenia das lesões como porencefalia ainda não foram elucidadas, sugere-se que as reações inflamatórias após infecção sejam essenciais para seu desenvolvimento (GASTRUCCI et al, 1990; GROOMS, 2004; HEWICKER-TRAUTWEIN & TRAUTWEIN, 1994).

## 6. CONCLUSÕES

- 1- Do total de 21 bovinos necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFRGS entre janeiro de 1996 e agosto de 2005, o número de casos de infecção pelo BVDV foi baixo, perfazendo um total de cinco animais, o que significa 23,8% dos bovinos suspeitos necropsiados nesse período.
- 2- A prevalência de abortos bovinos por BVDV é baixa, 1,86% neste estudo. Essa prevalência é relativa, levando em conta apenas os fetos remetidos a diagnóstico no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período entre junho 1999 e maio 2004.
- 3- As lesões macroscópicas ocorrem principalmente no trato digestivo, como ulcerações na cavidade oral, gengiva e língua, enterite, outras lesões também são freqüentes como atrofia de timo e linfadenomegalia.
- 4- As lesões histológicas ocorrem principalmente na língua, intestino delgado, linfonodos, cérebro e rim, porém não são específicas.
- 5- A técnica de imunistoquímica, utilizando anticorpo monoclonal anti-BVDV 15c5 e cromógeno *NovaRED*, em biópsias de pele para detecção de antígenos do BVDV é eficiente e facilita a distinção da melanina presente na pele.
- 6- Embora nenhum bovino tenha apresentado sintomatologia nervosa, o presente trabalho demonstrou que o cérebro e cerebelo podem ser considerados importantes órgãos para detecção do antígeno do BVDV pela técnica de imunistoquímica em tecido conservado em parafina, assim como pele e tecido linfóide.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BAKER, J. C. Bovine viral diarrhoea virus: A review. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 190(11): 1449-58. 1987.

BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 11(3): 425-445. 1995.

BARKER, I.K., DREUMEL, A.A.V. & PALMER, N. The Alimentary System. In: **Pathology of Domestic Animals.** 4<sup>th</sup> ed. v.2. Academic Press, Inc., San Diego, California. pp149-58. 1993.

BASZLER, T.V.; EVERMANN, J.F.; KAYLOR, P.S.; BYINGTON, T.C. & DILBECK, P.M. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. **Vet. Pathol.** 32: 609-18. 1995.

BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection: A window on the pathogenesis. In: Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 11(3): 447-76. 1995.

BOLIN, S.R. & GROOMS, D.L. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 20: 51-68. 2004.

BOTTON, S.A.; SILVA, A.M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. & FLORES, E.F. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31: 1429-38. 1998.

BRODERSEN, B.W. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** March; 20(1):85-93. 2004.

BROWN, T.T.; DELAHUNTA, A.; BISTNER, S.I.; SCOTT, F.W. & McENTEE, K. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Pathol.** 11: 486-505. 1974.

BROWNLIE, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. **Vet. Microbiol.** 23: 371-82. 1990.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C. & HOWARD, C.J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Res. Vet. Sci.** 46: 307-11. 1989.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C. & HOWARD, C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Vet. Rec.** 114: 535-36. 1984.

BRUM, M.C.S.; SCHERER, C.F.C.; FLORES E.F., WEIBLEN, R., BARROS, C.S.L. & LANGOHR, I.M. Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da diarreia viral bovina tipo 2 (BVDV-2). **Ciência Rural**. 32(5): 803-820. 2002.

CANAL, C.W.; STRASSER M.; HERTING C.; MASUDA, A. & PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhea (BVDV) and characterization of genome of BVDV from Brazil. **Vet. Microbiol.** 63: 85-97. 1998.

CARMAN, S.; DREUMEL, T.V.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A. & ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. **J Vet Diagn Invest.** 10: 27-35. 1998.

CORNISH, T.E.; VAN OLPHEN, A.L.; CAVENDER, J.L.; EDWARDS, J.M.; JAEGER, P.T.; VIEYRA, L.L.; WOODARD, L.F.; MILLER, D.R. & O'TOOLE, D. Comparison of notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **J Vet Diagn. Invest.** 17: 110-117. 2005.

DONE, J.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C. Bovine virus diarrhea mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. **Vet. Rec.** 119: 558-61. 1984.

EVERMANN, J.F. & RIDPATH, J.F. Clinical e epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. **Vet. Microbiol.** 89: 129-139. 2002.

FERNANDEZ, A.; HEWICKER, M.; TRAUTWEIN, G.; POHLENZ, J. & LIESS, B. Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Vet. Pathol.** 26: 26-32. 1989.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C.F.C.; GIL, L.H.V.G.; PILATI, C.; DRIEMEIER, D.; MOOJEN, V. & WENDELSTEIN, A.C. Identificação do vírus da diarreia viral bovina tipo 2 (BVDV-2) no sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 20(2). 2000.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F., ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A. & PITUCO, E.M.. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq. Vet. Bras.** 25(3): 125-134. 2005.

GASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; OSBURN, B.I.; FERRARI, M.; SAWYER, M.M. & ALDROVANDI, V. A study of some pathogenetic aspects of bovine viral diarrhea virus infection. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 13: 41-9. 1990.

GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Vet. Clin. Food Anim. Pract.** 20: 5-19. 2004.

GROOMS, D.L. & KEILEN, E.D. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** July, 9(4): 898-900. 2002.

HAINES, D.M.; CLARK, E.J. & DUBOVI, E.J. Monoclonal antibody-based immunohistochemistry detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Vet. Pathol.** Jan; 29(1):27-32. 1992.

HEWICKER-TRAUTWEIN, M. & TRAUTWEIN, G. Porencephaly, hydrancephaly and leukoencephalopathy in ovine fetuses following transplacental infection with bovine virus diarrhoea virus: distribution of viral antigen and characterization of cellular response. **Acta Neuropathol.** 87: 385-97. 1994.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. In: Bovine Viral Diarrhoea virus. **Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract.** 11(3):521-547. 1995

KENDRICK, J.W. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. **Am. J. Vet. Res.** 32(4): 533-44. 1971.

LARSSON, B.; NISKANEN, R. & LENIUS, S. Natural infection with bovine virus diarrhoea virus in a dairy herd: A spectrum of symptoms including early reproductive failure and retained placenta. **Anim. Reprod. Sci.** 36: 37-48. 1994.

LARSSON, B.; TRAVEN, M.; HARD AF SEGERSTAD, C. & BELAK, K. Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transient or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. **Res. Vet. Sci.** 58: 186-89. 1995.

LERTORA, J.; PAREDES, E. & REINHARDT, G. Inmunohistoquímica em biopsias de piel para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. [www.unne.edu.ar/cyt/2002/04](http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/04)

LERTORA, J.; PAREDES, E. & REINHARDT, G. Inmunohistoquímica em bulbos pilosos para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. [www.vet.unne.edu.ar/revista/14/revet14.diarr.pdf](http://www.vet.unne.edu.ar/revista/14/revet14.diarr.pdf)

LERTORA, J.; PAREDES, E.; REINHARDT, G. & ALBERDI, A. Inmunohistoquímica en biopsias de piel tratadas con proteína K y microondas para el diagnóstico en animales persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. **Arch. Med. Vet.** 35(1). 2003.

LIEBER-TENORIO, E.M., LANWEHR, A.; GREISER-WILKE, I.; LOEHR, B.I. & POHLENZ, J. Comparative investigation of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. **Vet. Microbiol.** 77: 163-74. 2000.

LONERAGAN, G.H.; THOMSON, D.U.; MONTGOMERY, D.L.; MASON, G.L. & LARSON, R.L. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 226 (4): 595-601. 2005

MARSHALL, D.J.; MOXLEY, R.A. & KELLING, C.L. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Pathol.** 33: 311-18. 1996.

McCLURKIN, A.W.; LITTLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; FRANK, G.H.; CORIA, M.F. & BOLIN, S.R. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. **Can. J. Comp. Med.** 48: 156-61. 1984.

MOENNIG, V. & LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. In: Bovine Viral Diarrhea virus. **Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract.** 11(3):477-87. 1995

NETTLETON, P.F. & ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses. **Br. Vet. J.** 151(6):615-42.1995.

NJAA, B.L; CLARK, E.G.; JANSEN E.; ELLIS, J.A. & HAINES, D.M. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. **J Vet Diagn Invest.** Sep, 12(5): 393-9. 2000.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: **Infectious Diseases of Livestock.** 2 ed. v.2. Oxford University Press Southern África, Cape Town. pp 946-69. 2004.

POTGIETER, L.N.D. Immunology of BVDV. In: Bovine Viral Diarrhea virus. **Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract.** 11(3):501-20. 1995.

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.; GAY, C.; BLOOD, D.C. & HINCHCLIFF, K. W. Diarréia viral bovina, doenças das mucosas, complexo doença pestivírus bovino. In: **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9 ed. Editora Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro; 2002. pp 974-93.

SALIKI, J.T. & DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Vet Clin Food Anim. Pract.** 20: 69-83. 2004.

SAMARA, S.I.; DIAS, F.C. & MOREIRE, S.P.G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Braz. J. Res. Anim. Sci.** 41(6): 396:406. 2004.

SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F.; FERNANDES, C.G.; DAMÉ, M.C. & GRAÇA, D.L. Hipoplasia cerebelar e pencefalia em bovinos Charolês no sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural.** 31(1): 149-153. 2001.

SCHUCH, L.F.D. Diarréia viral bovina. In: **Doenças de ruminantes e eqüinos.** 2 ed. v.1. Livraria Varela: São Paulo; 2001. pp 64-72.

SHI, S.R.; COTE, R. J. & TAYLOR, C. R. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. **J. Histochem. Cytochem.** 45(3): 327-343. 1997.

STOKSTAD, M. & LOKEN, T. Pestivirus in cattle: Experimentally induced persistent infection in calves. **J. Vet. Med.** 49: 494-501. 2002.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. Malformations of the central nervous system. In: SUMMERS, B.A; CUMMINGS, J.F. & DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. Mosby: St. Luis; 1995. 527p.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Med.** 91: 858-9. 1996.

WAKELEY, P.R.; TURNER, J.L.E.; IBATA, G.; KING, D.P.; SANDVIK, T.; HOWARD, P. & DREW, T.W. Characterization of a type 2 bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle in the UK. **Vet. Microbiol.** 102(1-2):19-24. 2003.

WILHELMSSEN, C.L.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; CHEVILLE, N.F. & KLUGE, J.P. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves. **Vet. Pathol.** 27: 235-43. 1990.

WOHRMANN, T.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; FERNANDEZ, A.; MOENNIG, B.; LIESS, B. & TRAUTWEIN, G. Distribution of bovine virus diarrhoea viral antigens in the central nervous system of cattle with various congenital manifestations. **J. Vet. Med. B.** 39(8): 599- 609. 1992.