

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

CARACTERIZAÇÃO DE UM SURTO DE DOENÇA DAS MUCOSAS ATÍPICA  
POR BVDV-1D

MATHEUS VIEZZER BIANCHI

PORTO ALEGRE, 2016

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

CARACTERIZAÇÃO DE UM SURTO DE DOENÇA DAS MUCOSAS ATÍPICA  
POR BVDV-1D

MATHEUS VIEZZER BIANCHI

Dissertação apresentada como requisito  
para a obtenção de grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias na área de  
concentração em Patologia Animal e  
Patologia Clínica, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE, 2016

MATHEUS VIEZZER BIANCHI

### CIP - Catalogação na Publicação

Viezzaer Bianchi, Matheus

Caracterização de um surto de doença das mucosas atípica por BVDV-1d / Matheus Viezzaer Bianchi. -- 2016.

71 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Diarreia viral bovina. 2. Pestivirus. 3. Bovinos. 4. Doença das mucosas. 5. Surto. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

CARACTERIZAÇÃO DE UM SURTO DE DOENÇA DAS MUCOSAS ATÍPICA  
POR BVDV-1D

Aprovado em 25 de fevereiro de 2016

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Ana Lucia Pereira Schild (UFPel)  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha base familiar composta pela minha mãe, Arlete, e minha irmã, Thais. Sempre estão dispostas a me ajudar e me aguentar nos piores momentos de pressão e estresse, valem ouro. Amo vocês.

Agradeço a meu pai, Eugênio, sempre atencioso comigo e me dando o exemplo de pessoa trabalhadora.

Agradeço à vó Maria, que firme e forte aos 92 anos, é meu exemplo de vida e segunda mãe. Muito do que eu sou hoje em dia é reflexo do que me ensinastes.

Agradeço aos meus tios Paulo, Noimar e Zeca por sempre me ensinarem desde pequeno como deve ser uma pessoa de caráter, trabalhadora, honesta, além de como deve ser um bom pai e marido.

Agradeço aos primos Gisele, Chico, Christian, Jean, Joca, Lupa, Rafael, Felipe, Mônia e Giovani e todos os demais familiares por todo suporte, conselhos e ensinamentos.

Agradeço aos amigos Leonardo, Saulo, Casquinha, José, Gabriel e Lucas pela amizade. Que seja longa!

Agradeço às vizinhas e amigas Fabiana e Edna por todos os conselhos, puxões de orelha e companhias. Ao Gabi também, que eu possa seguir sendo exemplo para ele, assim como ele muito me ensina mais dia a dia.

Agradeço ao professor David Driemeier por me orientar durante esses dois anos de mestrado, mas também desde o momento que me recebeu no Setor de Patologia Veterinária. És um exemplo de pessoa humilde acima do profissional.

Agradeço à professora Luciana por tantos ensinamentos e pelo auxílio fundamental no período que a substitui como professor.

Agradeço ao Professor Saulo por sempre estar disponível para ajudar, pelos conselhos de amigo e orientações durante a graduação e mestrado.

Agradeço aos colegas e amigos Guilherme, Suyene, Daniele e Cíntia pela ajuda enorme nesse trabalho e por todo o apoio durante o mestrado.

Aos colegas que já passaram pelo Setor de Patologia Veterinária e com os quais muito tive o orgulho de aprender. Muito obrigado André, Paulinho, Danilo, Fladimir, Angélica, Renata, Tati, Fabi, Gisele, Marcele e Eduardo!

Aos demais colegas do Setor de Patologia Veterinária, Bárbara, Lauren, Gabriela, Ronaldo, Lismara, Fernando, Marina, Welden, Verônica, Luiz, Raquel, Márcia, Rafaela, Paula, Thainã, Amaro e Bruna, muito obrigado pelo companheirismo!

## RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um *Pestivirus*, pertencente à família Flaviviridae, o qual é dividido em dois genótipos ou espécies (BVDV-1 e BVDV-2), e em pelo menos 20 subgenótipos de BVDV-1 (1a-1t) e três de BVDV-2 (2a-2c). O BVDV também pode ser classificado em biótipos [citopático(cp) e não-citopático(ncp)]. As perdas reprodutivas podem ser a consequência econômica mais importante da infecção. A infecção persistente (PI) pode ocorrer quando há uma infecção entre os 42 e 125 dias de gestação, e se o feto sobreviver, o bezerro será imunotolerante ao vírus e como resultado pode desenvolver doença das mucosas (DM). O objetivo desse estudo é descrever um surto de infecção por BVDV-1d em bezerros de corte que apresentaram lesões de DM atípica, abordando aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos e patológicos. O surto ocorreu em uma propriedade rural de bovinos de corte Angus localizada em Glorinha, Rio Grande do Sul, Brasil. Em um intervalo de 15 dias, 11 de 164 bezerros apresentaram sinais clínicos de anorexia, sialorreia acentuada, perda de peso e andar rígido com claudicação, progredindo para decúbito e morte em um curso clínico de sete dias. Todos esses 11 bezerros apresentavam em mucosa oral e nasal, região interdigital de membros torácicos e pélvicos extensas áreas de ulceração. Três bezerros foram necropsiados: úlceras orais e nasais foram observadas, frequentemente envolvendo gengiva, palato duro, palato mole e plano nasal; ulcerações lineares multifocais na língua, esôfago e rúmen; e também ulcerações multifocais arredondadas no abomaso. Além disso, o bezerro #2 exibiu na pele de regiões ventrais do corpo espessamento difuso com formação crostosa acentuada, ocasionalmente áreas de ulceração. Microscopicamente, as lesões ulcerativas em mucosas e pele consistiam em necrose superficial, com numerosas células apoptóticas, células epiteliais vacuolizadas e hiperqueratose paraqueratótica difusa acentuada. O exame imuno-histoquímico (IHQ) da pele dos três bezerros evidenciou acentuada imunomarcagem no citoplasma de células epiteliais, enquanto na mucosa oral evidenciou moderada a acentuada imunomarcagem. Todos os 11 bezerros mortos foram positivos no RT-PCR para detecção do *Pestivirus*, assim como outros 11 bezerros vivos (de 387 animais restantes no rebanho). Após quatro semanas, os exames de RT-PCR e IHQ dos 11 bezerros vivos foram repetidos com resultados positivos, comprovando o status de animais PI. O sequenciamento de partes do genoma determinou que todos os animais haviam sido infectados por um BVDV-1 do subgenótipo “d”. BVDV cp foi isolado das amostras de 8 bezerros mortos; enquanto apenas BVDV ncp foi isolado de amostras dos 11 bezerros vivos. Os achados patológicos, moleculares e virológicos permitiram concluir que esse foi um surto de DM atípico em bezerros causado por BVDV-1d com lesões restritas ao trato alimentar superior e pele. Como as características epidemiológicas e clínicas de doenças vesiculares podem ser muito similares ao observado, recomenda-se que os testes diagnósticos específicos para BVDV (histopatologia, IHQ e RT-PCR) sejam empregados rotineiramente na necropsia em surtos com lesões atípicas similares em bovinos.

## **ABSTRACT**

*Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a Pestivirus, belonging to the Flaviviridae family, also divided in two genotypes or species (BVDV-1 and BVDV-2), and in at least 20 subgenotypes of BVDV-1 (1a-1t) and three of BVDV-2 (2a-2c). BVDV can also be classified into biotypes (cytopathic and noncytopathic). Reproductive losses may be the most economically important consequence of the infection. Persistent infection (PI) may occur when there is an infection between 42 and 125 days of gestation, and if the fetus survives, the calf will be immunotolerant to the virus and a possible outcome is mucosal disease (DM). The aim of this study is to describe an outbreak of BVDV-1d infection in calves of a beef herd cattle that presented atypical DM lesions, with a clinical, epidemiological, virological and pathological approach. The outbreak occurred in a beef Angus cattle farm located in Glorinha, Rio Grande do Sul state, Brazil. Within 15 days, 11 of 164 calves presented clinical signs of anorexia, severe sialorrhoea, weight loss and stiff gait with lameness, progressing to recumbency, and death in a clinical course of seven days. All these 11 calves presented in oral and nasal mucosa, interdigital region of thoracic and pelvic limbs extensive areas of ulceration. Three calves were necropsied: oral and nasal ulcers were observed, often involving gingiva, hard palate, soft palate and nasal planum; multifocal linear ulcerations in tongue, esophagus and rumen; and also rounded multifocal ulcerations in the abomasum. In addition, calf #2 showed diffuse thickening of the skin with severe crust formation, occasionally ulceration, in ventral body regions. Microscopically, ulcerative lesions observed in mucosae and cutaneous lesions consisted of superficial necrosis, with numerous apoptotic cells, vacuolation of epithelial cells and severe diffuse parakeratotic hyperkeratosis. Immunohistochemistry (IHC) of skin of the three calves showed severe immunostaining in the cytoplasm of epithelial cells, while oral mucosa showed moderate to severe immunostaining. All 11 dead calves were positive in RT-PCR for detection of Pestivirus along with other 11 live calves (from 387 remaining animals from herd). After four weeks, RT-PCR and IHC of these 11 live animals were repeated with positive results, which prove the PI status of these animals. All animals were infected by BVDV-1 of subgenotype "d" according to parts of the genome of the virus that were sequenced.. Cytopathic BVDV was isolated from samples of 8 dead calves; only non-cytopathic BVDV were isolated from samples of 11 live animals. Pathological, molecular and virological findings allowed us to conclude that this was an outbreak of atypical DM in calves caused by BVDV-1d with lesions restricted to the upper alimentary system and skin. Since epidemiological and clinical features of vesicular diseases may be very similar to what was observed, it is recommended that BVDV diagnostic tests (histopathology, IHC and RT-PCR) should be routinely included in the necropsy workup in outbreaks with similar atypical lesions in cattle.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. Animal PI apresentando DM com dificuldade de ganho de peso e acentuada sialorréia. .... 55
- Figura 2.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro com DM atípica. Áreas multifocais ulceradas na mucosa oral, se estendendo à junção mucocutânea. A língua está com a superfície espessada e recoberta de forma multifocal a coalescente por um material fibrilar amarelado. .... 55
- Figura 3.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. A mucosa oral exibe úlcera focal recoberta por grande quantidade de fibrina. A língua está espessada de forma difusa e recoberta por fibrina, além de exibir áreas de ulceração. .... 56
- Figura 4.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. As papilas da mucosa oral estão difusamente atenuadas, arredondadas e avermelhadas. .... 56
- Figura 5.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro com DM atípica. A mucosa nasal exibe ulceração focalmente extensa recoberta por discreta quantidade de crostas. .... 57
- Figura 6.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2. Língua exibindo áreas multifocais de ulceração recobertas por fibrina. .... 57
- Figura 7.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. Rúmen com acentuado espessamento da mucosa por material amarelado friável, além de áreas multifocais de ulceração. .... 58
- Figura 8.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2. Rins exibindo áreas arredondadas multifocais brancacentas na superfície capsular. .... 58
- Figura 9.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro com DM atípica. Área focalmente extensa de ulceração grave com aspecto vesicular em região interdigital. ... 59
- Figura 10.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2, mucosa oral. Área focal de necrose do epitélio superficial, com numerosas células epiteliais apoptóticas hipereosinofílicas (observadas também no epitélio adjacente), além de vacuolização de células epiteliais basais, acentuado infiltrado inflamatório mononuclear de interface e hiperqueratose paraqueratótica na superfície. HE, 10x. .... 59
- Figura 11.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2, língua. Há de forma multifocal numerosas células epiteliais com citoplasma hipereosinofílico e núcleos picnóticos (células apoptóticas), além de acentuada hiperqueratose paraqueratótica. HE, 10x. .... 60
- Figura 12.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2. A. Mucosa oral. Área focal de necrose do epitélio com células apoptóticas e discreto infiltrado de neutrófilos (esquerda). No restante do epitélio há área focalmente extensa de vacuolização de células epiteliais basais com células apoptóticas no estrato espinhoso. HE, 40x. B.



Língua. Inúmeras células apoptóticas no estrato espinhoso e discreta degeneração de células epiteliais. HE, 40x..... 60

**Figura 13.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2, omaso. Áreas multifocais (setas) discretas com células epiteliais apoptóticas e vacuolização de células epiteliais. HE, 10x. .... 61

**Figura 14.** Surto de doença das mucosas atípica. A. Omaso, bezerro #2. Inúmeras células epiteliais hipereosinofílicas e picnóticas (apoptóticas) e vacuolização de células epiteliais. HE, 20x. B. Rúmen, bezerro #3. Desprendimento difuso do epitélio ruminal na junção mucosa-submucosa, com inúmeras células epiteliais apoptóticas e vacuolização de células epiteliais, além de moderado infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos em submucosa. HE, 20x. C. Abomaso, bezerro #2. Transição de área focalmente extensa de necrose da mucosa, caracterizada por debris amorfo eosinofílico. HE, 4x. D. Rim, bezerro #2. Infiltrado inflamatório multifocal intersticial discreto a moderado composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raras células gigantes multinucleadas de Langhans. HE, 20x ..... 62

**Figura 15.** Surto de doença das mucosas atípica. A. Pele, bezerro #2. Necrose difusa acentuada da epiderme, com inúmeras células epiteliais apoptóticas e vacuolizadas em epiderme e epitélio folicular, pústulas intracorneais e acentuada hiperqueratose paraqueratótica, além de moderado infiltrado inflamatório mononuclear em derme superficial e perifolicular. HE, 10x. B. Pele, bezerro #2. Inúmeras células epiteliais com citoplasma hipereosinofílico e núcleos picnóticos, além de acentuada vacuolização de células epiteliais, discreto infiltrado inflamatório mononuclear em derme. HE, 20x. C. Pele, bezerro #2. Inúmeras células epiteliais apoptóticas e vacuolizadas em epiderme, além de múltiplas pústulas intracorneais e hiperqueratose paraqueratótica acentuada. HE, 20x. D. Pele, bezerro #2. Epitélio folicular ocasionalmente exhibe células apoptóticas, além de discreto infiltrado inflamatório mononuclear perifolicular. HE, 40x..... 63

**Figura 16.** Surto de doença das mucosas atípica. A. Mucosa oral, bezerro #2. Intensa marcação intracitoplasmática em células epiteliais. IHQ anti-BVDV, 20x. B. Rúmen, bezerro #3. Moderada marcação intracitoplasmática em células epiteliais. IHQ anti-BVDV, 40x. .... 63

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**5' UTR** – Região 5' não traduzida

**BVD** – Diarreia viral bovina

**BVDV** – Vírus da diarreia viral bovina

**BVDV-1** – Vírus da diarreia viral bovina tipo 1

**BVDV-2** – Vírus da diarreia viral bovina tipo 2

**cp** – citopático

**DM** – Doença das mucosas

**dpi** – dias após a infecção inicial

**HE** – hematoxilina e eosina

**IHQ** – exame imuno-histoquímico

**ncp** – não-citopático

**NS** – Proteína não-estrutural

**ORF** – Fase aberta de leitura

**PI** – Persistentemente infectado

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RT-PCR** – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1 Histórico</b> .....	12
<b>2.2 Diarreia viral bovina no Brasil</b> .....	12
<b>2.3 Etiologia</b> .....	13
<b>2.4 Epidemiologia</b> .....	15
<b>2.5 Patogenia</b> .....	17
<b>2.6 Sinais clínicos</b> .....	19
<b>2.7 Diagnóstico</b> .....	21
2.7.1 Achados de necropsia e histopatológicos .....	22
2.7.2 Imuno-histoquímica .....	23
2.7.3 Isolamento viral, RT-PCR e ELISA por captura de antígeno (Ag-ELISA) ...	24
2.7.4 Detecção de anticorpos .....	25
2.7.5 Diagnósticos diferenciais .....	26
<b>2.8 Controle e prevenção</b> .....	26
<b>3. ARTIGO</b> .....	29
<b>4. FIGURAS ADICIONAIS</b> .....	55
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	64
REFERÊNCIAS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) causa infecção em ruminantes domésticos e selvagens mundialmente (BAKER, 1995) provocando a diarreia viral bovina (BVD). É um vírus do gênero *Pestivirus*, membro da família Flaviviridae, composto por uma fita simples de RNA polaridade positiva. O BVDV é dividido também em dois genótipos ou espécies: BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH *et al.*, 1994; SIMMONDS *et al.*, 2011). Além disso, há até o presente momento a classificação filogenética em 21 subgenótipos de BVDV-1 (1a-1u) e três de BVDV-2 (2a-2c) (TAJIMA *et al.*, 2001; VILCEK *et al.*, 2001; YESILBAG *et al.*, 2008; JENCKEL *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2015). O vírus é também classificado em biótipos, baseados na presença (cp) ou ausência (ncp) de efeito citopático visível no isolamento viral (BAKER, 1995).

Esse agente é um dos principais patógenos de bovinos, causando perdas significativas à bovinocultura (LANYON *et al.*, 2014). Dentre as consequências econômicas mais importantes estão as perdas reprodutivas e o vírus utiliza ainda o sistema reprodutor para se manter e se disseminar em um rebanho (GROOMS, 2004). Através desse mecanismo surgem os animais com uma infecção persistente, a qual ocorre quando há infecção *in utero* entre os dias 42 a 125 de gestação. Se o feto sobreviver, nascerá imunotolerante ao vírus e o disseminará ao rebanho (WILHELMSSEN *et al.*, 1991). Identificar e eliminar animais persistentemente infectados (PI) deve ser o principal foco no controle e prevenção de BVD (GROOMS, 2004). Uma consequência da infecção persistente é a condição denominada doença das mucosas (DM), a qual está associada com o surgimento de um biótipo cp de BVDV a partir de mutações (BROWNLIE *et al.*, 1984).

Os sinais clínicos da infecção podem variar de acordo com propriedades genéticas e antigênicas desses vírus. A maior parte das infecções transientes tem um curso leve a discreto, com febre e diarreia (BACHOFEN *et al.*, 2010).

O BVDV pode causar duas formas clínicas graves de infecção: a DM em animais PI e a forma aguda por cepas muito virulentas (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). Animais com DM apresentam curso clínico rápido e alta mortalidade (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). Tipicamente, exibem lesões múltiplas no trato alimentar superior e inferior, assim como depleção linfóide acentuada. A lesão característica de BVD consiste no intestino delgado em necrose com

perda de microvilosidades (LANYON *et al.*, 2014), além de placas de Peyer irregulares e recobertas por fibrina. No trato alimentar superior, são comuns erosões na cavidade oral, esôfago e rúmen. (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000). Já nos animais infectados de forma aguda pode ser observada febre acentuada e diarreia hemorrágica causada por cepas altamente virulentas de BVDV-2 (RIDPATH *et al.*, 2006), ou quadro de lesões orais ulcerativas e alta mortalidade por BVDV-1 (LUNARDI *et al.*, 2008; HESSMAN *et al.*, 2012). Todavia, à necropsia não é possível diferenciar as duas formas de infecção (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

No Brasil, a infecção por BVDV tem sido descrita desde o fim dos anos 60 (CORRÊA; NETO; BARROS, 1968) e estudos recentes têm verificado uma predominância de BVDV-1a e BVDV-2b entre a população de bovinos do Brasil através de análises filogenéticas (WEBER *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2015). BVDV-1d tem sido identificado a partir de amostras de cultivo celular e em lotes de soro fetal (SILVEIRA *et al.*, 2015), porém ainda não foi associado a surtos de alta mortalidade em bovinos.

Esse trabalho tem o objetivo de descrever um surto de doença das mucosas com lesões atípicas, alta morbidade e mortalidade por BVDV-1d em bezerros de uma propriedade de bovinocultura de corte, afetando principalmente o trato alimentar superior e o tegumento, através de uma abordagem clínica, epidemiológica, patológica e virológica.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 – Histórico**

A diarreia por BVDV foi descrita primeiramente em 1946 como uma doença transmissível, aguda, com alta morbidade e baixa mortalidade. Foi caracterizada, inicialmente, por uma leucopenia acentuada, febre alta, depressão, diarreia, erosões e hemorragias gastrointestinais (OLAFSON *et al.*, 1946), além de doença respiratória, morte embrionária prematura, teratogênese e aborto (OLAFSON *et al.*, 1946; BAKER *et al.*, 1954).

Atualmente, diversos surtos epizooticos de doença aguda, hemorrágica e diarreica com alta mortalidade tem sido relatados (PELLERIN *et al.*, 1994; CARMAN *et al.*, 1998) com distribuição mundial e endêmica em muitos países, ocasionando perdas econômicas significativas à bovinocultura de leite e corte, como perdas reprodutivas, redução na produção do leite, perda de condição corporal e infecções recorrentes devido aos efeitos imunodepressivos (GOENS *et al.*, 2002; GROOMS, 2004; COLLINS *et al.*, 2009).

Estudos realizados para estimar o impacto econômico da infecção pelo BVDV em rebanhos leiteiros indicam que as perdas situam-se entre US\$ 10.00 e US\$ 40.00 por terneiro nascido (HOUE, 2003). Nos Estados Unidos, o BVDV ocasiona perdas de mais de US\$ 400 milhões de dólares ao ano, sendo a doença viral mais dispendiosa do país (HANSEN *et al.*, 2010). Devido às implicações econômicas e de bem-estar envolvidas com a infecção por BVDV, muitos países (Áustria, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Noruega e Suécia) estão tomando medidas para a erradicação da doença (COLLINS *et al.*, 2009).

Quanto aos dois genótipos, BVDV-1 tem sido diagnosticado há muitos anos e está disseminado mundialmente, enquanto o BVDV-2 foi primeiramente identificado na América do Norte a partir de 1990, quando passou a ser detectado também em outros países (FLORES *et al.*, 2005; RIDPATH *et al.*, 1994; VILCEK *et al.*, 2001). A prevalência de anticorpos chega a atingir 70-80% dos animais e até 80% dos rebanhos na América do Norte e Europa (FLORES *et al.*, 2005).

### **2.2 Diarreia viral bovina no Brasil**

A condição denominada BVD foi inicialmente identificada no Brasil em 1968, quando uma doença gastroentérica com aspectos clínicos e patológicos compatíveis com a DM foi descrita (CORRÊA; NETO; BARROS, 1968). A partir de então, foram realizados diversos estudos sorológicos que demonstraram a ampla distribuição do BVDV no rebanho bovino brasileiro (FLORES *et al.*, 2005).

O vírus foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1974, porém devido à escassez de laboratórios com reagentes adequados aliada a pouca importância dada à infecção por BVDV entre os anos 70 e 90, os avanços quanto no estudo da doença foram mínimos e poucas amostras foram isoladas (FLORES *et al.*, 2005).

A partir dos anos 90, o número de isolados de BVDV no Brasil aumentou, com a maioria composta pelo genótipo BVDV-1 e do biótipo ncp (FLORES *et al.*, 2005). Atualmente a infecção pelo BVDV está amplamente difundida no rebanho brasileiro (LIMA *et al.*, 2004). Flores *et al.* (2002) identificaram no Brasil um aumento da prevalência de BVDV-2b, assim como outros trabalhos (BIANCHI *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011). Cortez *et al.* (2006) identificaram uma predominância de BVDV-1a e BVDV-2b no Brasil. Porém não foram observadas associações entre os genótipos e condições clínicas (BIANCHI *et al.*, 2011).

Weber *et al.* (2014) descreveram uma prevalência de 6,9% de infecção ativa por BVDV no RS em 346 rebanhos estudados (24/346) e na maioria (17/24) apenas um animal apresentava infecção. Pela classificação filogenética das amostras positivas, 57,6% eram BVDV-1 (1a, 1b e 1d) e 42,4% BVDV-2 (2b). Em um estudo mais recente, observou-se uma predominância de BVDV-1a (35,9%) e BVDV-2b (31,4%), seguidos por BVDV-1b, BVDV-1d e BVDV-2c, demonstrando extensa diversidade genotípica entre os isolados brasileiros (SILVEIRA *et al.*, 2015).

Portanto, o Brasil tem o BVDV disseminado e, apesar de possuir o maior rebanho bovino comercial do mundo, não possui programas de controle oficial e de erradicação para esse vírus (SILVEIRA *et al.*, 2015).

### **2.3 Etiologia**

O BVDV é um importante vírus pertencente ao gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*. O gênero inclui outros dois vírus antígenicamente relacionados: vírus da peste suína clássica e o vírus da doença da fronteira de ovinos (border disease virus). É um vírus envelopado pequeno (40-60 nm), com RNA linear de fita simples polaridade

positiva e genoma de aproximadamente 12.5 kb de comprimento (COLLETT *et al.*, 1988; SIMMONDS *et al.*, 2011).

O genoma apresenta um fragmento de fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos. Essa é processada por proteases virais e celulares em 11 a 12 proteínas estruturais e não estruturais: N<sup>pro</sup> (protease viral), C (capsídeo), E<sup>ms</sup>, E1, E2, p7, NS2/NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (VILCEK *et al.*, 2001). O ORF é flanqueado por duas sequências não codificadas nas extremidades 5' e 3'. A região 5' não traduzida (5'UTR), composta por 360-390 nucleotídeos, é altamente conservada entre os pestivírus e sua análise permitiu dividir o BVDV em espécies (genótipos) baseadas nas diferenças antigênicas e genéticas: BVDV-1 e BVDV-2 (COLLETT *et al.*, 1988; SIMMONDS *et al.*, 2011; RIDPATH *et al.*, 1994); além classificar também novos subtipos ou subgenótipos através da análise filogenética (VILCEK *et al.*, 2001). Todavia, essas regiões utilizadas para análises genotípicas não codificam proteínas virais e, portanto, os diferentes subtipos tem significância incerta na evolução da doença ou virulência do agente (GOENS, 2002).

A taxa de mutação em vírus contendo RNA é muito rápida, gerando, portanto uma diversidade ampla genotípica. Dessa forma, as cepas de BVDV são também divididas em pelo menos 21 subgenótipos de BVDV-1 (1a-1u) e em três de BVDV-2 (2a-2c) (VILCEK *et al.*, 2001; FULTON *et al.*, 2005a; JENCKEL *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2015). A heterogeneidade das cepas e diferenças de patogenicidade pode ter um papel determinante na patogênese e evolução clínica das infecções induzidas por BVDV (BAULE *et al.*, 2001), porém não parece haver tropismo individual de diferentes cepas por órgãos (FULTON *et al.*, 2005a). Ainda, a análise genética dos isolados de BVDV-1 da Europa e América do Norte, assim como dos isolados de BVDV-2 do Brasil, sugeriu que a segregação em subgenótipos está mais correlacionada com a localização geográfica de origem desses vírus (VILCEK *et al.*, 2001; FLORES *et al.*, 2002).

O agente também é dividido em biótipos não-citopáticos (ncp) e citopáticos (cp) baseados nos efeitos observados em cultivos celulares. Biótipos cp induzem vacuolização citoplasmática e apoptose em cultivo, o que não ocorre em biótipos ncp (BAKER, 1995; LANYON *et al.*, 2014). Os vírus ncp constituem a maioria dos isolados de campo e estão relacionados com as diversas manifestações clínicas da doença, inclusive a geração de animais PIs (GROOMS, 2004), enquanto os vírus cp estão relacionados à DM (BROWNLIE *et al.*, 1984).



Também é descrita uma nova espécie de *Pestivirus* denominada “HoBi-like”, inicialmente detectada em um lote de soro fetal bovino no Brasil (SCHIRRMIEIER *et al.*, 2004). A mesma espécie também foi descrita como causadora de DM atípica com hemorragias e necrose restritas à cavidade oral e trato respiratório superior (DECARO *et al.*, 2014), assim como doença respiratória grave a partir de cepa cp, porém sem sinais clínicos e lesões características de DM (DECARO *et al.*, 2012). Essa nova espécie de BVDV não é denominada BVDV-3, devido à distância genética e antigênica em relação aos demais vírus da espécie (DECARO *et al.*, 2012). Conforme Weber *et al.* (2014), essa espécie atípica de BVDV é ainda pouco prevalente no Sul do Brasil.

## 2.4 Epidemiologia

Bovinos são os hospedeiros naturais desse gênero de *Pestivirus* (SIMMONDS *et al.*, 2011) e os principais disseminadores da doença no rebanho. Porém a infecção por BVDV tem também sido relatada em espécies domésticas e selvagens da ordem Artiodactyla, como alpacas, cervos, ovinos e caprinos, por vezes com infecção persistente (SCHERER *et al.*, 2001; DUNCAN *et al.*, 2008; BEDENICE *et al.*, 2011; BACHOFEN *et al.*, 2013). Dessa forma, essas espécies de ruminantes são suscetíveis à infecção por BVDV e podem infectar ou serem infectados por bovinos, sendo potenciais reservatórios do vírus, mantendo a doença no rebanho; todavia, bovinos disseminam o *Pestivirus* de forma mais eficiente do que pequenos ruminantes (BACHOFEN *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2014).

Os *Pestivirus* (BVDV-1, BVDV-2 e “HoBi-like”) podem causar infecção aguda ou persistente em bovinos (WEBER *et al.*, 2014). A infecção persistente ocorre devido à capacidade do vírus de cruzar a barreira placentária e infectar fetos não-imunes, gerando bezerros PI, os quais demonstram retardo no crescimento e excretam quantidade variáveis de vírus ao longo de suas vidas (BAKER *et al.*, 1995), funcionando como um reservatório do BVDV e fonte de infecção para o restante do rebanho. O contato focinho-focinho ou sexual com bovinos PI é o meio mais comum de infecção aguda ou transiente entre os animais (LANYON *et al.*, 2014). Se introduzidos em rebanhos livres da doença, os animais PI podem causar perdas econômicas significativas. A prevalência de animais PI em um rebanho é variável, variando de 0,4 a 1,7% (CARLSSON *et al.*, 1989), sendo geralmente menor do que 2%, até números expressivos como 44 em um total de 120 bezerros infectados pelo BVDV-2a ncp

(KANE *et al.*, 2015) ou 25-30% se ocorre exposição de um grande número de vacas soronegativas com prenhez inicial ao BVDV ncp (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

A maioria das infecções agudas é causada por BVDV ncp (BAULE *et al.*, 2001), e tem transmissão através de diversos fluidos corporais, incluindo secreções nasais, urina, leite, sêmen, saliva, secreção ocular e fluidos fetais (MEYLING; HOUE; JENSEN, 1990).

O vírus também pode ser transmitido através do sêmen de touros infectados de forma aguda, persistente ou prolongada. Touros PI tem eficiência reprodutiva reduzida, porém podem gerar progênie (GROOMS, 2004). O BVDV sobrevive à criopreservação e processamento do sêmen para inseminação artificial, de forma que a infecção de vacas suscetíveis pode ocorrer através da inseminação ou monta natural (GIVENS *et al.*, 2009). Voges *et al.* (1998) descreveram ainda uma forma de infecção persistente localizada no testículo de um touro não virêmico e soro-positivo para BVDV, na qual o bovino elimina continuamente o vírus através do sêmen ao longo de sua vida. Para diferenciar de animais PI, essa condição é denominada infecção prolongada testicular, podendo durar até 2.75 anos (GIVENS *et al.*, 2009), enquanto a transmissão pode ocorrer em até cinco meses após a infecção inicial (GIVENS *et al.*, 2003). A significância epidemiológica da infecção prolongada testicular é limitada devido à dificuldade de transmissão por monta natural ou inseminação artificial (GIVENS *et al.*, 2009).

Animais infectados de forma aguda são tidos como mau transmissores do agente por terem baixa capacidade de transmissão por contato (NISKANEN *et al.*, 2000). Nesses animais, o vírus é eliminado dos tecidos em até nove dpi, com viremia entre o 4º e 10º dia após a infecção. Nesse período o vírus pode ser identificado no soro, sangue e secreções nasais, porém há desenvolvimento de imunidade ao vírus em duas semanas (MEYLING; HOUE; JENSEN, 1990; LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2004; COLLINS *et al.*, 2009).

Os fatores de risco envolvidos com a infecção por BVDV são relacionados a medidas de biossegurança, manejo da reprodução, tamanho do rebanho, introdução de animais, contato direto com outros bovinos ou outras espécies, pastejo coletivo e a idade dos animais (WEBER *et al.*, 2014).

Na Alemanha, 95% das cepas de BVDV circulantes são BVDV-1, enquanto apenas 5% pertencem ao BVDV-2 (JENCKEL *et al.*, 2014; VILCEK *et al.*, 2005),

assim como na Áustria (VILCEK *et al.*, 2001). Na Austrália, o subgenótipo predominante é o 1c; na Índia, 1b; na Espanha, 1b, 1c e 1h; no Reino Unido, 1a, 1b e 1i (VILCEK *et al.*, 2005). Na Suíça, Bachofen *et al.* (2010) descreveram a predominância de BVDV-1e, 1h e 1k. No Chile, Pizarro-Lucero *et al.* (2006) observaram a predominância de BVDV-2 (17/31).

Aparentemente a prevalência de BVDV-2 circulante na América do Sul é maior do que a reportada na América do Norte, Europa, Ásia e Austrália (WEBER *et al.*, 2014). Em um estudo retrospectivo nos EUA, o subgenótipo 1b foi o mais frequentemente isolado (45,8%), seguido pelo 1a (28,2%), sendo que 89,3% do total das amostras positivas para BVDV eram vírus ncp (FULTON *et al.*, 2005a). Assim, é possível prever que países que compartilham fronteiras e têm fortes laços comerciais na bovinocultura, tanto no comércio de animais como de sêmen, apresentam cepas de BVDV circulantes similares, como, por exemplo, Canadá, EUA, Reino Unido e Nova Zelândia, nos quais os BVDV-1a e BVDV-1b predominam. Acredita-se que em Moçambique, a maior prevalência de BVDV-1 e subgenótipos similares aos observados na Áustria se deve ao comércio histórico entre os dois países (VILCEK *et al.*, 2001).

Através de medidas de prevenção e controle, a prevalência de animais PI tem diminuído, de forma que em bovinos de leite essa prevalência é em torno de 0,1%, enquanto em bovinos de corte é menor ainda (DUBOVI *et al.*, 2013).

## 2.5 Patogenia

O BVDV tem acesso à mucosa orofaríngea e tecidos linfoides da região através da ingestão ou inalação, onde ocorre a replicação primária do agente (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). Além disso, o vírus infecta uma variedade extensa de células. Todavia, a síndrome clínica e os achados patológicos indicam que o vírus tem um tropismo por múltiplos órgãos, variando de casos gastrointestinais, reprodutivos, tegumentares, respiratórios, mistos (respiratório e digestivo) e casos de infecção persistente (BAKER, 1995; FULTON *et al.*, 2005a). Em animais PI, o vírus é detectado em todos os órgãos e tecidos. Já em animais infectados de forma aguda, em três dias após a infecção inicial (dpi), o vírus é observado em tecidos linfoides; 6 dpi o vírus está amplamente distribuído em tecidos linfoides e mucosas do trato digestório e trato respiratório; enquanto em 9 e 13 dpi, o antígeno viral não é mais observado na maioria dos tecidos (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2004).

Assim, o vírus tem predileção por células do sistema imune (monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos), tendo como consequência a morte celular dessas linhagens (BRODERSEN, 2014), além de um caracterizado tropismo por células epiteliais (BIELEFELDT-OHMANN, 1983). A imunodepressão da infecção aguda é associada com os efeitos diretos do BVDV em linfócitos T e B circulantes, além de apoptose de linfócitos de placas de Peyer (LANYON *et al.*, 2014).

A infecção da fêmea durante a gestação pode resultar em infecção fetal. Os efeitos dessa infecção são complexos e dependem do período em que ocorre. Durante os primeiros 18 dias de gestação, a infecção do embrião não ocorre, pois o BVDV não consegue penetrar a zona pelúcida (MOENNIG; LIESS, 1995). Todavia, alterações inflamatórias uterinas após a infecção por BVDV até os 41 dias de gestação podem resultar em um ambiente incompatível para o desenvolvimento do embrião, levando à morte embrional e redução das taxas de prenhez (CARLSSON *et al.*, 1989; GROOMS, 2004).

Após a implantação, a infecção do feto em desenvolvimento pode ocorrer com ambos os biótipos de BVDV, com resultado dependente do período da infecção, da imunocompetência do feto, do biótipo viral envolvido e sua virulência (GROOMS, 2004). Se a infecção *in utero* por BVDV ocorrer no período entre os 18-42 a 125-150 dias de gestação, pode ocorrer o desenvolvimento de um feto PI, o qual será imunotolerante ao vírus (WILHELMSSEN *et al.*, 1991; GROOMS, 2004; KANE *et al.*, 2015). Esse período gestacional engloba o término do período embrional e o desenvolvimento da imunocompetência fetal (BEDENICE *et al.*, 2011). Assim, esses indivíduos não produzem anticorpos anti-BVDV, tampouco apresentam resposta específica via linfócitos T ao vírus (BACHOFEN *et al.*, 2013), visto que as proteínas virais são reconhecidas como antígenos próprios (GROOMS, 2002).

Animais PIs podem desenvolver doença grave com lesões disseminadas nas superfícies mucosas alimentares e tecidos linfoides, condição referida como DM. Essa ocorre como resultado da infecção persistente com uma cepa não-citopática (ncp) seguida por uma infecção pós-natal com uma cepa citopática (cp) homóloga. Essa tem origem a partir de mutações ou de recombinações da cepa ncp presente no animal PI (BROWNLIE *et al.*, 1984; BACHOFEN *et al.*, 2010;), mas também pode ser transmitida por via horizontal aos outros animais PIs (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000). As mutações ou recombinações do RNA podem ter origem de uma cepa homóloga ou cepas heterólogas, e envolvem a clivagem da região NS2/NS3, resultando

na produção de proteína NS3, a qual induz apoptose celular (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

A infecção entre os dias 80 e 150 de gestação pode levar a efeitos teratogênicos no feto, pois é nessa fase da gestação em que ocorre organogênese e o sistema imune está se tornando funcional. As anomalias congênitas envolvendo o sistema nervoso central são as mais comuns, as quais incluem hipoplasia cerebelar, microencefalia, hidrocefalia, porencefalia, hidranencefalia e hipomielinização (GROOMS, 2004). Podem também ocorrer malformações envolvendo o sistema oftálmico, como degeneração ocular, microftalmia, catarata e neurite óptica, além de outros defeitos, como braquignatismo, alopecia/hipotricose, hipoplasia tímica, osteogênese desordenada e retardo no crescimento (GROOM, 2004; LANYON *et al.*, 2014; KANE *et al.*, 2015).

Quando a infecção é tardia na gestação (150 e 180 dias), o feto tem a organogênese completa e é capaz de montar resposta imune eficiente ao vírus, eliminando a infecção e produzindo anticorpos específicos ao agente (GROOMS, 2004; HANSEN *et al.*, 2010). No segundo e terceiro trimestres de gestação, também pode ocorrer o aborto, defeitos congênitos ou o nascimento de terneiros fracos (KANE *et al.*, 2015).

Interferons tipo I (IFN-I) são importantes mediadores de respostas imunes inatas ao vírus. A interferência do BVDV na sinalização por IFN-I é um fator para o estabelecimento de PI. Macrófagos infectados por BVDV ncp falham em induzir IFN-I; todavia, quando infectados por BVDV cp promovem a liberação desse mediador (CHARLESTON *et al.*, 2001) e, portanto, não desenvolvem infecção persistente (BROWNLIE; CLARKE; HOWARD, 1989). Dessa forma, animais PI não desenvolvem resposta imune inata e humoral para eliminar a infecção, disseminando o agente (BROWNLIE *et al.*, 1987).

Liebler-Tenorio, Ridpath e Neill (2004) sugerem que as lesões observadas na infecção aguda por BVDV tem contribuição do sistema imune mediado por células T através da destruição de células infectadas, o que não ocorre em animais PI devido à imunotolerância.

## **2.6 Sinais clínicos**

A infecção por BVDV tem uma apresentação clínica ampla, variando de subclínica a doença clínica grave caracterizada por diarreia, pirexia e úlceras múltiplas em trato alimentar superior e inferior (BAKER, 1995; LANYON *et al.*, 2014).

A infecção aguda de bovinos soronegativos e imunocompetentes por BVDV geralmente é subclínica ou resulta em doença leve, com febre, leucopenia, descarga nasal discreta, diarreia, erosões discretas em mucosa oral e imunodepressão (BAKER, 1995). A pirexia atinge o pico aos 8 a 9 dpi, enquanto a leucopenia ocorre entre os três e 14 dpi (COLLINS *et al.*, 2009). Essa causa uma imunodepressão que culmina em infecções secundárias com patógenos respiratórios, como PI-3, BHV-1 e *Mannheimia haemolytica* (BAULE *et al.*, 2001).

Por sua vez, a doença na forma aguda também pode ser grave, com alta morbidade e mortalidade em todas as faixas etárias (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). Genótipos do tipo 2 são geralmente associados com doença aguda (LUNARDI *et al.*, 2008) e considerados mais virulentos, caracterizada por doença grave com trombocitopenia (ODEÓN *et al.*, 1999), diarreia sanguinolenta, hemorragias e alta mortalidade (JENCKEL *et al.*, 2014). Todavia, BVDV-2 já foi isolado em condições clínicas diversas: BVD aguda com sinais hemorrágicos, BDV crônica e fetos sem lesões (FLORES *et al.*, 2002). Portanto, apenas uma pequena proporção desses isolados são altamente virulentos (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). O genótipo BVDV-1 também tem sido descrito em quadros agudos graves recentemente. Lunardi *et al.* (2008) descreveram um surto agudo de BVDV-1b caracterizado por depressão, anorexia, diarreia aquosa, sialorreia, fraqueza, lesões orais erosivas, com morte rápida após o início dos sinais clínicos. Da mesma forma, Hessman *et al.* (2012) descreveram um surto agudo de BVDV-1b e 2a que resultou em alta mortalidade e lesões ulceradas extensas em mucosas.

As perdas reprodutivas podem ser a consequência econômica mais importante da infecção (GROOMS, 2004). Abortos são comumente descritos associados à infecção pelo vírus, dependendo do tempo gestacional em que ocorre a infecção (EVERMANN; RIDPATH, 2002). Em uma descrição de sete surtos no Canadá (CARMAN *et al.*, 1998), cinco desses apresentaram um aumento no índice de abortos com uma média de 44% de taxa de aborto em fêmeas prenhas. Além disso, podem ocorrer redução da taxa de concepção, morte embrional prematura e defeitos congênitos (SPRECHER *et al.*, 1991).

Animais PI podem ser clinicamente normais, podem nascer com menor peso significativo do que os demais animais (KANE *et al.*, 2015) ou exibirem sinais de fraqueza, como perda de apetite, perda de condição corporal, com dificuldade de ganho de peso, diarreia e desidratação (BAKER, 1995; BACHOFEN *et al.*, 2010). São animais suscetíveis a infecções secundárias e doença das mucosas, a qual é fatal e resulta na baixa sobrevivência desses animais (VOGES; YOUNG; NASH, 2006).

A DM é uma síndrome que ocorre em bezerros PI por BVDV ncp seguida por uma infecção por BVDV cp. Na forma aguda, é caracterizada por lesões gastrointestinais e curso clínico de duas a três semanas de duração. Apesar de a morte ocorrer geralmente com poucos dias de evolução ou até duas semanas, alguns animais podem sobreviver por meses (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). Na forma crônica, o bovino se recupera após uma fase transiente de diarreia leve e lesões em mucosas leves, com a evolução clínica de 35 a 45 dias até 18 meses (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000; POTGIETER, 2004). Ambos os cursos clínicos terminam em diarreia grave e rápida deterioração dos animais (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000).

Tentativas de correlacionar genótipos e subgenótipos de BVDV com virulência e quadros clínicos têm sido pouco conclusivas (FLORES *et al.*, 2002). Todavia, Baule *et al.* (2001) observaram que BVDV-1d estava associado a doença respiratória em animais infectados de forma aguda por cepa cp (DM atípica). Ainda, Bachofen *et al.* (2010) observaram uma tendência em BVDV-1h ser isolado de casos de DM em animais mais velhos, enquanto BVDV-1e foi o subgenótipo predominante em lesões pulmonares em animais jovens.

## **2.7 Diagnóstico**

Seja para investigar casos individuais, erradicar BVDV de um rebanho ou identificar animais que são um risco epidemiológico (PIs) é essencial realizar a detecção do vírus ou de um antígeno específico do agente (LANYON *et al.*, 2014). O BVDV pode causar duas formas clínicas graves de infecção: a DM em animais PI e a forma aguda por cepas muito virulentas. Todavia, à necropsia não é possível diferenciá-las. É necessário, assim, para o diagnóstico definitivo avaliar o aspecto epidemiológico e realizar a detecção e a caracterização antigênica e molecular do vírus envolvido (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

### 2.7.1 Achados de necropsia e histopatológicos

Os achados clínicos e patológicos não são suficientes para distinguir DM de doença aguda por BVDV (ODEÓN *et al.*, 1999, 2003). Na doença aguda as lesões são restritas ao trato gastrointestinal e predominantes em membranas mucosas de lábios, língua, esôfago e rúmen, com necrose multifocal desses epitélios na microscopia (LUNARDI *et al.*, 2008). Nos surtos descritos por Carman *et al.* (1998), as lesões em mucosas do trato gastrointestinal eram similares à DM, variando de discretas a severas, e geralmente discretas em animais com menos de seis meses.

Animais PI podem ser clinicamente normais, sem lesões macroscópicas ou microscópicas (DUNCAN *et al.*, 2008), ou podem exibir lesões características de DM à necropsia. Assim, é recomendável empregar métodos diagnósticos para diagnóstico de BVDV em bovinos que morrem de forma súbita, até mesmo aqueles sem lesões macroscópicas (KANE *et al.*, 2015).

A DM se caracteriza macroscopicamente por lesões em mucosas do trato digestivo, necrose de tecido linfoide, inflamação do casco e dermatite, as quais não são observadas em bovinos persistentemente infectados (WILLHELMSEN *et al.*, 1991). Sabe-se que a DM é caracterizada por lesões hemorrágicas, necróticas e ulcerativas nessas localizações (BROWNLIE *et al.*, 1984), sendo as lesões no trato alimentar superior e inferior múltiplas e dispersas, e também mais graves na DM aguda. No trato alimentar superior, em ambas as formas, são comuns erosões na cavidade oral, esôfago e rúmen. Já no trato alimentar inferior, a lesão característica de BVD na forma aguda consiste em placas de Peyer do intestino delgado irregulares e recobertas por fibrina e coágulos (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000), revelando na microscopia uma perda de microvilosidades (necrose) sobre as placas de Peyer (LANYON *et al.*, 2014), destruição completa de glândulas das criptas subjacentes, colapso da lâmina própria e lise de tecido linfoide folicular (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016); enquanto na forma crônica as lesões são caracterizadas por úlceras nas mucosas do intestino delgado e grosso sem associação com tecido linfoide (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000), e na microscopia exibem dilatação de criptas, preenchidas por células epiteliais necróticas, muco e células inflamatórias (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

A ocorrência de dermatite pode ocorrer tanto na forma aguda como na crônica, assim como descrito por Liebler-Tenorio *et al.* (2000) que observaram erosões em espaços interdigitais em animais com DM aguda (8/9) e DM crônica (3/5). Já Potgieter



(2004) descreveu essas lesões como comuns na forma crônica da DM, com áreas de alopecia e hiperqueratose na região cervical, erosões crônicas no períneo, vulva, prepúcio, espaço interdigital, na sola do casco e ao redor das pinças e dedos acessórios. As lesões afetando os membros (dermatite interdigital, dermatite em metacarpos, coronite e laminite) podem estar presentes em animais afetados cronicamente, resultando em claudicação. Nesses, a pele fica seca e irregular, especialmente sobre a cernelha, dorso, região perineal, prepucial e vulvar, enquanto a pele das regiões mediais dos membros anteriores e posteriores se torna amarelada e úmida (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). Ferreira *et al.* (2008) descreveram dois casos de DM com dermatite generalizada severa crostosa afetando a pele ao redor do focinho, face interna das orelhas, base dos cornos, banda coronária e espaço interdigital. Esses apresentavam também lesões ulcerativas na cavidade oral que se estendiam à base da língua, faringe e esôfago.

As lesões epiteliais na pele e mucosas escamosas são similares (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). A necrose de queratinócitos no estrato espinhoso pode ocorrer na DM, levando à perda das junções intercelulares do epitélio queratinizado da pele, focinho, cavidade oral, esôfago, rúmen, retículo e omaso. Assim, essas superfícies tendem a sofrer erosões e úlceras, expondo o tecido conjuntivo subjacente (BIELEFELDT-OHMANN, 1995), com acentuada hiperqueratose reativa (FERREIRA *et al.*, 2008). Células individuais ou grupos de células se tornam eosinofílicas, tumefeitas e com núcleos picnóticos. Esses focos de células coalescem e formam áreas de necrose extensas do epitélio, com formação de vesículas entre a junção de lâmina própria e epiderme, levando a erosões ou úlceras, assim como hiperqueratose e paraqueratose com acúmulo de epitélio necrótico na pele de animais com DM crônica (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

A infecção pelo BVDV-1d cp pode resultar em doença respiratória primária em bezerros imunocompetentes e soronegativos ao agente (BAULE *et al.*, 2001). BVDV-2 tem sido relacionado a surtos severos de enterite hemorrágica aguda em bovinos jovens, ocorrendo concomitantemente com fatores de produção intensiva de bovinos (ODEÓN *et al.*, 2003).

### 2.7.2 Imuno-histoquímica

Animais PI apresentam o vírus em uma variedade ampla de tecidos, e o antígeno pode ser demonstrado através do exame imuno-histoquímico (IHQ) a partir de biópsias de pele. Esse é um método eficaz de identificar o antígeno viral em tecidos parafinados, além de ser aplicável para grandes números de amostras, devido à facilidade da coleta, apesar de ser laborioso, suscetível a erros técnicos e depender da experiência do avaliador para a determinação dos resultados (CORNISH *et al.*, 2005).

Nesse exame, utiliza-se geralmente o anticorpo 15C5, o qual é específico para a glicoproteína viral estrutural E<sup>ms</sup> (GIVENS *et al.*, 2009). Em animais PI, observa-se marcação imuno-histoquímica característica em queratinócitos da epiderme, e todas as regiões do folículo piloso, o que permite diferenciar a infecção persistente de infecção aguda por BVDV. A marcação nos queratinócitos é predominante em estrato basal e espinhoso; nos folículos pilosos é no istmo e infundíbulo, além de células da matriz e papila dermal (NJAA *et al.*, 2000). Todavia, em um estudo mais recente, Cornish *et al.* (2005) descreveu que a IHQ a partir de amostras de orelha pode também detectar animais infectados de forma aguda, com padrão de marcação similar aos animais PI. Dessa forma, esses animais devem ser testados novamente através do isolamento viral ou RT-PCR após 30 dias do teste inicial.

### 2.7.3 Isolamento viral, RT-PCR e ELISA por captura de antígeno (Ag-ELISA)

Tanto o isolamento viral como métodos de detecção do antígeno viral são os métodos mais importantes para determinar a infecção por BVDV (GOENS, 2002). A distribuição do antígeno viral em bezerros PI ocorre em todos os tecidos, nem sempre associada com lesões. Por sua vez, em animais infectados de forma aguda, o vírus é observado, principalmente, em tecidos linfoides entre o 5º e 9º dia de infecção (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2004).

O isolamento viral é realizado através da inoculação do vírus em células renais bovinas livres de *Pestivirus*. Até 2004, o isolamento viral era referido como o padrão-ouro para o diagnóstico de BVDV. Todavia, atualmente o RT-PCR passou a ser amplamente aceito como o teste padrão para o diagnóstico de infecção por BVDV. É um método preferível ao isolamento viral devido ao menor tempo necessário, menor custo, alta sensibilidade e por não ser restrito a laboratórios com instalações adequadas para o cultivo celular. Ainda, uma variedade de amostras pode ser utilizada com sucesso no RT-PCR, incluindo sangue, leite, saliva e tecidos linfoides (KIM; DUBOVI, 2003),

sem que o armazenamento por tempo prolongado interfira na análise (VILCEK *et al.*, 2001). O RT-PCR tem também a vantagem de detectar pelo soro qualquer indivíduo infectado pelo BVDV em pools de até 50 amostras. Esses pools, quando positivos, podem ser testados em pools menores ou individualmente (SMITH *et al.*, 2008).

Aplicando-se primers específicos à 5'UTR, N<sup>pro</sup>, E2 e NS3 o RT-PCR é também capaz de diferenciar genótipos e subgenótipos de BVDV (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994; LETELLIER *et al.*, 1999; FULTON *et al.*, 2005a; SILVEIRA *et al.*, 2015). A análise da região N<sup>pro</sup> permite segregar melhor os subgenótipos dos isolados de BVDV-1 (VILCEK *et al.*, 2005), enquanto a análise da região 5'UTR permite alocar os isolados de *Pestivirus* em genótipos (VILCEK *et al.*, 2001).

O resultado positivo do RT-PCR não define o status clínico do animal, pois detecta infecção aguda, persistente e animais vacinados com vacina modificada viva (DUBOVI, 2013). Para tal, é recomendado repetir o teste em um intervalo mínimo de quatro semanas, com resultados positivos indicando PI (LANYON *et al.* 2014). A ausência do vírus em uma amostra coletada pelo menos 19 dias posteriormente à coleta inicial confirma a infecção aguda (MEYLING; HOUE; JENSEN, 1990).

Todavia, o biótipo só pode ser determinado por isolamento viral (GOENS, 2002), de forma que para confirmar a DM, devem ser isolados em cultivo celular do animal afetado ambos BVDV ncp como cp (LANYON *et al.*, 2014).

O método Ag-ELISA é uma alternativa eficiente que está sendo utilizada por laboratórios de diagnóstico veterinário através de amostras de soro e biópsia de orelha para detectar animais PI (CORNISH *et al.*, 2005), porém não é idealizado para detectar infecção aguda. Duas proteínas altamente conservadas do BVDV podem ser o antígeno alvo nesse teste: NS3 (p80) e E<sup>rns</sup> (E<sup>0</sup>) (DUBOVI, 2013).

#### 2.7.4 Detecção de anticorpos

A detecção de anticorpos é um método útil para determinar o status imune de um animal e qualquer exposição prévia ao BVDV. O resultado positivo na detecção de anticorpos em animais não vacinados indica que esse indivíduo foi previamente exposto ao BVDV, mas não é PI. Fêmeas prenhas com resultado positivo podem estar gestando um feto PI (LANYON *et al.*, 2014). Por sua vez, animais PI não produzem anticorpos específicos ao BVDV com o qual foram infectados durante a gestação (WILHELMSSEN

*et al.*, 1991; BACHOFEN *et al.*, 2013;), porém podem responder imunologicamente a cepas heterólogas de BVDV (BEDENICE *et al.*, 2011).

Os métodos mais comumente utilizados para a detecção de anticorpos específicos para BVDV são o teste de soroneutralização (SNT) e o ELISA para anticorpo. O SNT é altamente específico, mas pode ter resultados variáveis dependendo da cepa viral ou do tipo celular utilizado (DUBOVI, 2013). Entretanto, uma variedade de amostras, como soro e leite, pode ser utilizada no ELISA para anticorpo, que é um teste rápido e barato, além de ter alta sensibilidade e especificidade (NETTLETON; ENTRICAN, 1995).

### 2.7.5 Diagnósticos diferenciais

A doença deve ser diferenciada de outras condições em bovinos que cursam com diarreia e/ou erosões/ulcerações do trato gastrointestinal, como salmonelose, criptosporidiose, coccidioses e helmintoses, assim como condições que provocam falhas reprodutivas e efeitos teratogênicos, como o vírus da língua azul. A prevalência e epidemiologia dessas condições devem ser consideradas para realizar o diagnóstico diferencial (POTGIETER, 2004).

Em casos que se observam lesões orais graves e ulcerações em mucosas, o diagnóstico diferencial deve incluir a estomatite vesicular, estomatite papular e a febre aftosa (HESSMAN *et al.*, 2012). A febre aftosa é geralmente caracterizada por baixa mortalidade, ausência de diarreia e disseminação rápida (POTGIETER, 2004).

BVD também deve ser diferenciada de febre catarral maligna, devido à degeneração hialina e necrose fibrinoide de arteríolas na submucosa e mesentério que pode provocar. Essa lesão é geralmente mais leve do que na febre catarral maligna, além de BVDV também causar involução de tecido linfoide, enquanto a febre catarral maligna provoca uma resposta linfoproliferativa característica (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016), além de estar associada com a presença de ovinos ou ungulados selvagens (POTGIETER, 2004).

## 2.8 Controle e prevenção

Há três pontos essenciais no controle e prevenção do BVDV: identificação e eliminação de PIs, imunização através de vacinação e implementação de medidas de biossegurança (DUBOVI, 2013).

A doença é primariamente disseminada e mantida no rebanho através de indivíduos PIs. Portanto, estratégias de controle têm focado em remover a fonte de infecção contínua para o rebanho, através da identificação e eliminação desses animais (LANYON *et al.*, 2014). A prevalência de animais PI varia de 1% a 2%, de forma que um grande número de indivíduos da população deve ser testado (BRODERSEN, 2014).

Rebanhos com baixa soroprevalência de anticorpos para BVDV são populações em risco que podem sofrer graves consequências com a introdução da agente no local. Por sua vez, rebanhos com alta soroprevalência teriam pouco benefício com a utilização da vacinação contra BVDV, sendo o foco do controle e prevenção voltado à identificação de animais PIs, visto que a alta soroprevalência é indicativa infecção recente na população (LANYON *et al.*, 2014).

A partir da eliminação dos PIs, a reinfecção do rebanho deve ser prevenida através da aplicação de altos níveis de biossegurança (LANYON *et al.*, 2014) e é importante monitorar todas as vacas e bezerros por pelo menos dois anos após um surto de BVD, a fim de identificar e remover animais PI (KANE *et al.*, 2015). Novilhas e touros devem ser examinados para identificação de antígenos de BVDV previamente à aquisição e introdução no rebanho. O controle adequado para evitar a infecção fetal requer imunidade adequada do rebanho, imunização de novilhas suscetíveis antes da monta e métodos eficientes para detectar infecção transiente ou persistente (EVERMANN; RIDPATH, 2002).

O monitoramento sistemático de touros de centrais de inseminação artificial também deve ser realizado, devido à possível disseminação do vírus pelo sêmen (FLORES *et al.*, 2005). A biossegurança de fêmeas prenhes com 40 a 100 dias de gestação pode ser o ponto mais importante para o controle de BVD, visando evitar a geração de novos animais PIs no rebanho (GROOMS, 2004).

Há evidência de proteção cruzada imunológica entre algumas cepas de BVDV, incluindo diferentes genótipos (CASTRUCCI *et al.*, 1975;; SCHNACKEL; CHASE, 2003). No entanto, um trabalho mais recente demonstrou proteção cruzada imunológica incompleta entre subgenótipos de BVDV, em que a vacinação com BVDV-1a e BVDV-2a não preveniram a infecção por BVDV-1b a partir de animais PI (FULTON *et al.*, 2005b). Portanto, a segregação genética/antigênica do BVDV em dois genótipos e

múltiplos subgenótipos tem implicações no diagnóstico e controle por vacinação (FLORES *et al.*, 2002), de modo que vacinas que contêm subgenótipos distintos aos circulantes em infecções naturais no rebanho provavelmente não forneçam a proteção adequada aos animais (FAIRBANKS; SCHNACKEL; CHASE, 2003; FULTON *et al.*, 2005a).

Antigamente, o subgenótipo predominante nas vacinas tradicionais para BVD era o BVDV-1a (RIDPATH; BOLIN, 1998). Essas eram vacinas polivalentes (BVDV, BHV-1, PI-3 e BRSV) e inativadas produzidas com isolados Norte-Americanos e Europeus. As vacinas mais recentes, também polivalentes e inativadas, por sua vez, tendem a incluir também o BVDV-2 e adjuvante oleoso ou hidróxido de alumínio, de forma que a resposta imune é tanto humoral quanto celular (FAIRBANKS; SCHNACKEL; CHASE, 2003). A maior preocupação quanto à eficácia dessas vacinas é devido à grande variabilidade antigênica (FLORES *et al.*, 2005; FULTON *et al.*, 2005a) e genética do BVDV (DENG *et al.*, 2015) de forma que a formulação de uma vacina eficiente deve incluir os isolados de *Pestivirus* que circulam em uma determinada região (RIDPATH, 2010).

No Brasil só são comercializadas vacinas inativadas para o BVDV (SILVEIRA *et al.*, 2015), induzindo resposta humoral nos animais. Entretanto, uma parcela significativa dos animais não responde à vacinação ou produzem títulos neutralizantes variáveis e de curta duração (VOGEL *et al.*, 2002). Ainda, as vacinas atualmente presentes não contêm os pestivírus “HoBi-like” e subgenótipos recentemente identificados de BVDV-1 e BVDV-2 (SILVEIRA *et al.*, 2015).

Lima *et al.* (2004) avaliaram a utilização de dois isolados cp de BVDV-1 e BVDV-2 atenuados por passagens múltiplas em cultivo celular (vacina modificada viva), os quais induziram títulos altos de anticorpos neutralizantes para ambos genótipos virais. Todavia, as vacinas atenuadas contra o BVDV não são licenciadas no Brasil apesar de terem maior eficácia (FLORES *et al.*, 2005). Vacinas atenuadas podem causar infecção transiente pós-vacinal e devem, portanto, ser diferenciadas de isolados de campo (FULTON *et al.*, 2005a), assim como podem induzir DM, falhas reprodutivas e defeitos congênitos (GOENS, 2002).

### **3. ARTIGO**

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “Outbreak of atypical mucosal disease in calves by BVDV-1d”, o qual foi redigido segundo as normas do periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* para ser submetido em breve.

**Outbreak of atypical mucosal disease in calves by BVDV-1d**

Matheus V. Bianchi; Guilherme Konrad; Suyene O. de Souza; Daniele M. Bassuino; Simone Silveira; Ana C. S. Mósena; Cláudio W. Canal; David Driemeier<sup>1</sup>; Saulo P. Pavarini

From the Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Bianchi, Konrad, De Souza, Bassuino, Driemeier and Pavarini); and Department of Veterinary Virology, School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Silveira, Mósena and Canal).

<sup>1</sup> Corresponding Author: David Driemeier, Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil 91540-000. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

Short running title: Atypical mucosal disease in calves by BVDV-1d



**Abstract.** Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a Pestivirus, Flaviviridae family, divided in genotypes and in subgenotypes (1a-1u and 2a-c). When persistent infection (PI) occurs, the calf will be immunotolerant to BVDV, possibly developing mucosal disease (MD). This study describes an outbreak of BVDV-1d infection in calves with atypical MD. In seven days, 11 of 164 calves presented anorexia, sialorrhoea, weight loss, lameness, recumbency and death. Three calves were necropsied, and there were extensive areas of ulceration in interdigital region, oral and nasal mucosa ulcers; linear ulcerations in tongue, esophagus and rumen; and rounded ulcerations in abomasum. Calf #2 showed thickening of ventral body skin with crust formation. Microscopically, both mucosa and skin had superficial necrosis, with apoptosis and vacuolation of epithelial cells, and severe parakeratosis. Immunohistochemistry (IHC) showed moderate to severe immunostaining in the cytoplasm of epithelial cells in skin and mucosa. All 11 dead calves were positive in RT-PCR for detection of Pestivirus along with other 11 live calves from the herd. After four-week interval, RT-PCR and IHC were positive again, which proves the PI status. Virus sequences from these 22 calves were 100% homologous and belonged to BVDV-1d. Cytopathic BVDV were isolated from 8 dead calves; and non-cytopathic from the 11 live animals. Pathological and virological findings allowed us to conclude that this was an outbreak of atypical MD in calves caused by BVDV-1d with lesions restricted to the upper alimentary system and skin. Since epidemiological and clinical pathological features of vesicular diseases may be very similar, BVDV diagnostic tests should be included in outbreaks with similar atypical lesions.

**Key-words:** BVDV; pestivirus; cattle; outbreak; mucosal disease; diagnosis.

## Introduction

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a member of the genus *Pestivirus*, a single stranded positive-sense RNA virus, within the family *Flaviviridae*. BVDV has been divided into two genotypes or species: BVDV-1 and BVDV-2.<sup>28</sup> Furthermore, there are at least 21 subgenotypes of BVDV-1 (1a-1u)<sup>8,32</sup> and three of BVDV-2 (2a-2c).<sup>15</sup> BVDV can also be classified into biotypes, which are based on the presence (cp) or absence (ncp) of visible cytopathic effect in infected cell cultures.<sup>2</sup>

BVDV is one of the main pathogens of cattle and causes significant economic losses to livestock industry worldwide.<sup>18</sup> Reproductive losses may be the most economically important consequence of BVDV infection, which uses the reproductive system to maintain and spread itself in the herd.<sup>11</sup> In Brazil, BVDV infection has been reported since the end of the 60s<sup>6</sup> and recent studies have verified a predominance of BVDV-1a and BVDV-2b among Brazilian cattle using phylogenetic analysis.<sup>27,33</sup>

Clinical signs and consequences of BVDV infection may vary according to genetic and antigenic properties of these viruses. Most transient infections have a mild course.<sup>1</sup> Acutely infected animals may rarely suffer from high-grade fever, with bloody diarrhea that can be caused by some highly virulent BVDV-2 strains and disseminated mucosa ulcerations by BVDV-1.<sup>19,24</sup>

Persistent infection (PI) may occur in BVDV infection, when a dam is infected between 42 and 125 days of gestation. This PI calf will be immunotolerant to this specific strain and will shed the virus to the herd.<sup>34</sup> Identifying and eliminating PIs should be the major focus to control and prevent BVDV.<sup>11</sup> An outcome of PI is a condition called mucosal disease (MD), that is associated with the appearance of a cp

BVDV biotype arising from mutation of the ncp BVDV already circulating in the PI animal.<sup>5</sup>

MD is generally sporadic and in an infected herd has a low morbidity rate. It presents with erosions, ulcerations and large areas of mucosal necrosis<sup>23</sup> in segments or throughout the entire gastrointestinal system.<sup>34</sup> It is characterized by hemorrhagic, necrotic and ulcerative lesions primarily in Peyer's patch, besides loss of microvilli (necrosis) and intestinal gland crypts dilated by cellular debris.<sup>5,18</sup> Diarrhoea usually develops two to three days after the onset of clinical signs.<sup>23</sup>

This work aims to describe an outbreak of atypical mucosal disease infection by BVDV-1d in calves of a beef herd cattle affecting the upper alimentary system and integument with high morbidity and mortality rates, with a clinical, epidemiological, virological and pathological approach.

## **Materials and Methods**

### **Clinical, epidemiological and histopathological features**

The study was performed on a beef cattle herd that suffered numerous losses of calves in a short period. Epidemiological data and clinical signs of the herd were obtained through field work and with the veterinary of the herd. Samples of three calves that died by the disease were collected during necropsy, fixed in 10% buffered formalin for 24-48 h, trimmed, routinely processed for histology, embedded in paraffin and cut at 3 µm. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin.

### **Immunohistochemistry**

Sections of oral mucosa, ear skin, skin and small intestine were submitted to immunohistochemistry. Monoclonal BVDV antibody was used (15C5<sup>a</sup>) at a dilution of 1:500 in phosphate buffered saline (PBS). The antigens were retrieved through protease XIV<sup>b</sup> for 15 minutes at room temperature. Unspecific reactions were blocked with 5% skimmed milk for 15 minutes. Amplification signal was achieved by using biotinylated secondary antibody, followed by labelled streptavidin-biotin-alkaline phosphatase complex (LSAB + System AP<sup>c</sup>) for 20 minutes each at room temperature. The reaction was revealed with Permanent Red solution<sup>c</sup>. As previously described, brain cortex and ear notch sections were used as positive controls.<sup>26</sup> Primary antibody was replaced by PBS in negative control sections.

### **RT-PCR and phylogenetic analysis**

Total RNA was isolated from serum of all animals and from spleen/lymph nodes of the three animals necropsied. Serum from RT-PCR positive live animals was collected and tested again after four-weeks to identify PI animals. Total RNA was obtained using TRIzol® LS Reagent<sup>d</sup>, according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and PCR were performed using SuperScript® III Reverse Transcriptase<sup>d</sup> and Platinum® Taq DNA Polymerase<sup>d</sup>, respectively. For partial amplification of the 5'UTR of pestivirus, the PanPesti primers were used.<sup>33</sup> All positive samples using PanPesti primers were also tested with the 324/326 primers to amplify a fragment of 5'UTR. To determine the genetic identity, sequencing of N<sup>pro</sup> was performed with primers BD1/BD3.<sup>32</sup>

PCR amplification products were purified using a Nucleo Spin Extract II Kit<sup>e</sup> according to the manufacturer's directions. Both strands were sequenced using a Big Dye Terminator cycle sequencing kit, version 3.1, on an ABI PRISM 3100 Genetic

Analyzer<sup>f</sup>. Sequences that were generated in the present study were aligned with representative pestivirus strains that were retrieved from GenBank using a Muscle algorithm contained in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software package, version 6 (MEGA6).<sup>29</sup> Evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method<sup>12</sup> with substitution model which best fitted. Consequently Kimura 2-parameter<sup>16</sup> was chose for both genomic regions (5'UTR and N<sup>pro</sup>), with invariable sites. A gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites with five categories for the N<sup>pro</sup> sequences. All evolutionary analyses were conducted in MEGA6.<sup>29</sup>

### **Virus isolation**

RT-PCR positive samples (serum, spleen/lymph nodes homogenates) were submitted to virus isolation, using pestivirus-free Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) in 24-well microtiter plates with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% horse serum and antibiotics. The plates were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and examined daily for up to 4 days to observe cytopathic effect. Four consecutive passages were carried out with each sample.

### **Additional exams**

This outbreak was reported to the official organ of animal sanitary control due to the clinical signs resembling a vesicular disease. Swab samples were collected from vesicular-like ulcers in oral mucosas. These were submitted to RT-PCR for foot-and-mouth disease virus (FMDV) and indirect sandwich-ELISA (IN-ELISA) for vesicular stomatitis (VS) in a laboratory certified by the government as described.<sup>36,37</sup>

## **Results**

### **Clinical and epidemiological features**

The outbreak occurred in a rearing beef Angus cattle herd located in Glorinha, Rio Grande do Sul state, Brazil (29° 52' 50" S; 50° 46' 59" W), with 500 ha of total area in 2015. The herd was kept in native pasture and the reproductive management consisted of natural breeding with bulls from the farm during the summer. The herd was closed, so there was no introduction of new animals, and the cattle did not kept contact with animals from other farms at the borders of the property. Vaccination was performed for foot-and-mouth disease, rabies and clostridiosis. The herd was composed of 398 cattle, including 164 calves of 3-5 months-old. The outbreak lasted for 15 days between January and mid of February 2015, wherein 11 of these calves (offspring of heifers) presented clinical signs of anorexia, severe sialorrhoea, progressive weight loss and stiff gait with lameness, progressing to recumbency and death in a clinical course of 7 days (Fig. 1.A). Morbidity rate observed in calves was of 6.7% (11/164) and mortality rate was 100% (11/11).

### **Gross findings**

During physical exams, all eleven calves that succumbed to the disease presented extensive areas of ulceration in oral and nasal mucosa, interdigital region of thoracic and pelvic limbs (Fig. 1.B), that varied from mild to moderate in animals that were not necropsied (8 calves). Three of these calves were submitted to necropsy and at external examination poor body condition was observed. Oral and nasal ulcers varying from mild (Calf #1) to severe (Calves #2 and #3) were also noted (Fig. 1.C), often involving gingiva, hard palate (Fig. 1.D), soft palate and nasal cavity. The tongue (Calves #2 and

#3), esophagus (Fig. 1.E) and rumen (Calf #3) also exhibited severe multifocal to linear ulcerations, covered by yellowish fibrillary material (fibrin) in the mucosa. Abomasum of Calf #2 also showed rounded multifocal to coalescing ulcerations in the mucosa (Fig. 1.F). In addition, diffuse thickening with severe crust formation, occasionally ulceration, of the skin in axillary, ventral abdomen and inguinal regions was observed in Calf #2. Furthermore, the kidneys of Calf #2 showed multifocal rounded whitish areas measuring 2 mm of diameter in capsular surface.

### **Microscopic findings**

On microscopic examination, ulcerative lesions observed in oral mucosa, tongue, hard and soft palate, nasal mucosa, esophagus, rumen and abomasum consisted of severe multifocal necrosis in superficial epithelium, with numerous hipereosinophilic epithelial cells presenting picnotic nuclei (apoptotic cells), in addition to vacuolation of epithelial cells with moderate inflammatory infiltrate of neutrophils in mucosa. There was also a moderate inflammatory infiltrate in mucosa-submucosa junction (interface) of lymphocytes and plasma cells. Superficially, there was severe diffuse parakeratotic hyperkeratosis intermixed with focus of ulceration of the mucosa covered by cellular debris and coccobacilli bacterial myriads (Fig. 2.A).

Cutaneous lesions in Calf #2 were characterized by severe necrosis of superficial epidermis with numerous apoptotic and vacuolated cells, in addition to intracorneal pustules and severe parakeratotic hyperkeratosis (Fig. 2.B). There was also moderate inflammatory infiltrate of lymphocytes, plasm cells and macrophages in superficial dermis. Some sections of skin showed diffuse ulceration of epidermis covered by severe amounts of fibrin. The same apoptotic and vacuolated cells were observed in follicular

epithelium, which presented mild inflammatory infiltrate of lymphocytes and plasma cells.

The kidney of Calf #2 showed mild multifocal interstitial lymphohistiocytic inflammatory infiltrate.

### **Immunohistochemistry, RT-PCR, phylogenetic analysis and viral isolation**

Swab samples of vesicular-like ulcers from oral mucosa were both negative in RT-PCR for FMD and in IN-ELISA for VS.

Immunohistochemistry of skin of the three calves submitted to necropsy showed severe immunostaining in cytoplasm of epidermal epithelial cells and epithelium of hair follicles. Sections of oral mucosa showed moderate (Calf #1) to marked (Calves #2 and #3) immunostaining in cytoplasm of epithelial cells (Fig. 2.C). On small intestine sections, immunostaining varied from absent (Calf #2), to focal in Peyer's patch (Calf #1) and diffuse moderate in mucosa and Peyer's patch (Calf #3).

All eleven dead calves were positive in RT-PCR along with other eleven live calves (from 387 remaining animals from herd). After 4-week interval, RT-PCR and immunohistochemistry of these positive live animals (also offspring of heifers) were repeated through collection of serum and ear notch biopsy samples, respectively. All these calves presented at immunohistochemistry of ear notch marked immunostaining in cytoplasm of epithelial cells of epidermis and hair follicles (Fig 2.D), as well as positive results in RT-PCR, which proves the PI status of these animals.

Viruses from twenty-two animals belonged to the BVDV-1d subgenotype and were very similar genetically (98.8-100% nucleotide identity in 250 nt of 5'UTR). BVDV-1d sequence from one animal is shown in 5'UTR and N<sup>pro</sup> phylogenetic tree in the Supplemental figure 1.



Cytopathic BVDV was isolated from samples of 8/11 dead animals, whereas none cytopathic virus was isolated from samples of eleven live calves, only ncp BVDV.

## **Discussion**

The diagnosis in this outbreak was obtained through gross, microscopical and virological findings, which allowed us to conclude that it was an outbreak of atypical mucosal disease in calves by BVDV-1d. Gross and microscopic findings observed in this outbreak were very similar to the findings described in an outbreak of acute BVDV-2a associated with extensive oral lesion and mucosal ulcerations, high morbidity and mortality<sup>14</sup> and also an acute outbreak of BVDV-1b in calves with similar gross lesions predominantly at the mucosal membranes of the tongue, lips, esophagus and rumen.<sup>19</sup> However, in the present outbreak, 11 calves died in a short period with MD, since cp BVDV was isolated from the majority of them. Tentative differentiation of MD from severe acute BVD mainly relies on isolation of cp virus from the affected animal.<sup>35</sup> MD was classified as atypical due to the higher morbidity, which is not common for MD that is generally sporadic in a herd<sup>23</sup>, with low morbidity but very high mortality.<sup>31</sup>

Lesions described in natural outbreaks of severe acute BVD usually overlaps with those observed in mucosal disease.<sup>19</sup> Individual cell necrosis and vacuolation in the stratum basale and stratum spinosum of the squamous epithelia of the tongue and esophagus are lesions described in typical MD, associated with small intestine crypt epithelial degeneration and necrosis as prominent findings<sup>21</sup> and also lysis of the follicular lymphoid tissues of Peyer's patches.<sup>31</sup> However, the calves here described did not present intestinal and lymphoid lesions, which are distinctive for BVD. Lesions were restricted to upper alimentary system mucosas (Calves #1, #2 and #3) and skin

(Calf #2), causing a generalized dermatitis, as was described in an outbreak of BVDV infection,<sup>21</sup> in which it was observed severe crustaceous dermatitis in six calves, that were characterized by necrosis in the stratum basale and stratum spinosum and presence of parakeratosis. Parakeratotic hyperkeratosis is a common non-specific response in many chronic dermatosis.<sup>13</sup> A study has described two cattle with MD associated with generalized dermatitis in cattle with 35 to 45 days of clinical evolution;<sup>9</sup> although the cases here described were more characterized as being acute with 7 days of evolution. Parakeratosis in BVD is related to epithelial cell tropism of the virus<sup>21</sup> and possibly it occurred in the skin and mucosa due to the severe necrosis of the epithelium with numerous apoptotic cells observed in microscopical examination.

Skin lesions in absence of digestive pathology are not the typical manifestation of either BVD or MD. However, the clinical presentation and pathogenesis of BVDV are complex, with no pathognomonic clinical signs. The infection results in a wide spectrum of conditions ranging from subclinical to severe fatal disease.<sup>25</sup> This is consequence of variation between the strains, like virulence, due to genetic and antigenic diversity of BVDV<sup>21</sup> and also differences between the host, as species, immune status, reproductive status, age and concurrent infections with other pathogens.<sup>25</sup> Considering that the herd was closed, the heifers probably lacked immunity to the strain 1d. Thus, these animals were more susceptible to the infection by BVDV during pregnancy, generating a large number of PI offspring. Mucosal disease can occur with different clinical pictures, even without the classical signs and lesions, as it has happened in this report and in others.<sup>7</sup>

BVDV-1d has been detected in cattle worldwide, with high frequency in some countries and causing wide clinical signs.<sup>17,22,30</sup> In Brazil, this is the first report of BVDV-1d causing atypical MD, although this subgenotype has been detected both in

healthy animals and in farms with reproductive problems, as well as in fetal bovine serum and in follicular fluid, representing important sources of BVDV.<sup>27</sup> The strain of BVDV-1d detected in the present study is closely genetically to strains previously described<sup>22,27</sup> of different regions of the country, indicating that this specific strain of BVDV may be widespread.

Similar lesions affecting skin have been described associated with subtype 1b in Argentina in an outbreak, but no cp BVDV was isolated in these cases.<sup>21</sup> BVDV-1b has been associated with acute BVDV disease in Brazil, however it was based on epidemiological evidences (high morbidity, no vaccination for BVDV and the absence of evident intercurrent infections and immunodepression) and not on virus isolation.<sup>19</sup> Possibly these cases were also atypical MD, since the gross and microscopical findings are very similar to ours, with lesions associated to cytopathic effect of the virus. A study also revealed that isolates from subtype 1d are able to induce primary respiratory disease in immunocompetent calves,<sup>3</sup> although in the present cases no pulmonary lesions were observed. However, currently these isolates initially named BVDV-1d by the referred study<sup>3</sup> would be classified as other subgenotypes, due the phylogenetic difference with BVDV-1d reference strains.

Due to the high morbidity and clinical presentation, such as sialorrhoea and loss of weight, associated with the gross lesions differential diagnosis included vesicular stomatitis (VS) and foot-and-mouth disease (FMD). Lesions observed here in oral mucosa and interdigital skin were grossly similar, but in microscopical examination, numerous epithelial cells showed hyper eosinophilic cytoplasm and picnotic nuclei (apoptotic cells), which are not seen in VS and FMD, wherein there is dissociation of cells in deeper layers of the stratum spinosum and distinct spongiosis leading to vacuole formation. These diseases do not cause hydropic degeneration of the epithelial cells and

nuclei remain normal.<sup>31</sup> The outbreak here described affected eleven calves with 3-5 months that died in a short period, differing from the epidemiology of FMD: very high morbidity with low mortality, all age groups affected and loss of productive efficiency.<sup>31</sup>

The outbreak described in the present report was notable because of the substantial impact of the atypical mucosal disease, with eleven dead calves in a short period, along with the emergence of many PI animals, which remained healthy, disseminating the virus for the rest of the herd. The exact point source of this BVDV-1d entry into this herd is unknown. A hypothesis is that two bulls acquired in the previous year were infected with BVDV; however these animals were not breeding at that moment. Although both were negative for BVDV in RT-PCR from serum and IHC of ear notch biopsy, these bulls could have an infection in testis (transient, prolonged or persistent infection), in which can shed the virus in semen for as long as five months after infection; <sup>10,20</sup> however, the semen was not tested. It appears for the genetic similarity of isolates and for the epidemiological profile that there was a single cp BVDV that took place in one animal and that animal transmitted the virus to the ten herd mates in a short period. Thus, eleven have succumbed to mucosal disease and other eleven PI animals remained healthy, since they were not infected by the cp virus.

Control of BVDV infections in herds is dependent on identification and removal of PI animals, <sup>4</sup> due to the importance of these in the virus maintenance in the herd. This preventive measure along with others (biosecurity, vaccination and continuing surveillance) are strongly recommended to minimize BVDV-associated losses and to prevent an outbreak that could have devastating effects on animal health and productivity, such as in this case.

The gross and microscopical lesions associated with the molecular and virological findings, such as immunohistochemistry, RT-PCR and viral isolation allowed us to conclude that this was an outbreak of atypical mucosal disease caused by BVDV-1d with high morbidity and short clinical course. MD was also classified as atypical due to locations of lesions. These were restricted to the upper alimentary system and skin and absent in small and large intestines, resembling clinical and pathological presentation of vesicular diseases affecting cattle. Since epidemiological and clinical features of vesicular diseases (VS and FMD) may be close to our case, it is recommended that BVDV diagnostic tests should be routinely included in differential diagnosis of these diseases.

### **Acknowledgements**

We thank the technician Cíntia de Lorenzo for her assistance in the IHC performed in this study.

### **Sources and manufacturers**

- a. BVD MAb 15c5, Syracuse Bioanalytical, East Syracuse, NY, USA
- b. Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
- c. DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA.
- d. Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.
- e. Macherey-Nagel, Düren, Germany.
- f. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

### **Declaration of conflicting interests**

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## **Funding**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) supported this study.

## **REFERENCES**

1. Bachofen C, et al. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet Microbiol* 2010;141:258-267.
2. Baker JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995;11,425-445.
3. Baule C, et al. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhea virus type I. *J Clin Microbiol* 2001;39(1),146-153.
4. Brodersen BW. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Path* 2014;51,453-464.
5. Brownlie J, et al. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* 1984;114,535-536.
6. Corrêa WV, et al. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo [Clinicopathological note of a mucous disease in Sao Paulo]. *Arqs Inst Biol* 1968;35(4),141-151. Portuguese.
7. Decaro N, et al. Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-Like pestivirus. *J Clin Microbiol* 2014;52,2946-2954.

8. Deng M, et al. Prevalence Study and Genetic Typing of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Four Bovine Species in China. *Plos One* 2015;10(4),e0121718.
9. Ferreira LCL, et al. Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos, Mato Grosso do Sul [Mucosal disease associated with generalized dermatitis in cattle, Mato Grosso do Sul]. *Pesqui Vet Bras* 2008;28(6):285-292. Portuguese.
10. Givens MD, et al. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microb* 2009;139,42-51.
11. Grooms DL. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004;20,5-19.
12. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003;52,696-704.
13. Hargis AM, Ginn PE. The Integument. In: Zachary JF, McGavin MD, ed. *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2012:983.
14. Hessman BE, et al. Acute bovine viral diarrhea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. *J Vet Diagn Invest* 2012;24(2),397-404.
15. Jenckel M, et al.: Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhea virus detected by deep sequencing. *J Virol* 2014; 88,6983-6992.
16. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16,111-120.
17. Kuta A, et al. Predominance of bovine viral diarrhea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. *Vet Microbiol* 2013;166,639-644.

18. Lanyon SR, et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet J* 2014;199,201-209.
19. Lunardi M, et al. Outbreak of acute bovine diarrhea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Res Vet Sci* 2008;85(3),599-604.
20. Newcomer BW, et al. Laboratory diagnosis and transmissibility of bovine viral diarrhea virus from bull with a persistent testicular infection. *Vet Microbiol* 2014;170,246-257.
21. Odeón AC, et al. Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet Microbiol* 2003;96,133-144.
22. Otonel RAA, et al. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2014;46,87-92.
23. Potgieter LND. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: Coetzer JAW & Tustin RC. *Infectious diseases of livestock*. 2nd ed. Vol 2. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, 2004; 946-969.
24. Ridpath JF, et al. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet Microbiol* 2006;114,196-204.
25. Ridpath JF. Bovine viral diarrhea virus: global status. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2010;26(1),105-121.
26. Santos AS, et al. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarréia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul [Clinical, pathological, immunohistochemical and viral aspects of five calves persistently infected with



- bovine viral diarrhoea virus in a farm of Rio Grande do Sul, Brazil]. *Pesqui Vet Bras* 2011;31(10),885-892. Portuguese.
27. Silveira S, et al. Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. *Transbound Emerg Dis* 2015. Epub ahead of print.
  28. Simmonds P, et al. Family Flaviviridae. In: King AMQ, et al. *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011:1003-1020.
  29. Tamura K, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30,2725-2729.
  30. Toplak I, et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet Microbiol* 2004;99,175-185.
  31. Uzal FA, et al. Alimentary System: Infectious and parasitic diseases of the alimentary tract. In: Maxie MG, ed. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th ed. Vol 2. Edinburgh, UK: Saunders Elsevier, 2016; 117-140.
  32. Vilcek S, et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 2001;146,99-115.
  33. Weber MN, et al. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res* 2014;191,117-124.
  34. Wilhelmsen CL, et al. Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am J Vet Res* 1991;52:269-275.
  35. World Organization for Animal Health (OIE). *Bovine Viral Diarrhoea 2015*: Available from: [http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health\\_standards/tahm/2.04.08\\_BVD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf) (accessed 12 July 2015).

36. World Organization for Animal Health (OIE). Foot and Mouth Disease, 2012: Available from: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.05\\_FMD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf) (accessed 14 January 14, 2016).
37. World Organization for Animal Health (OIE). Vesicular Stomatitis, 2010: Available from: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.19\\_VESICULAR\\_STOMITIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.19_VESICULAR_STOMITIS.pdf) (accessed 14 January 14, 2016).

## Figure legends

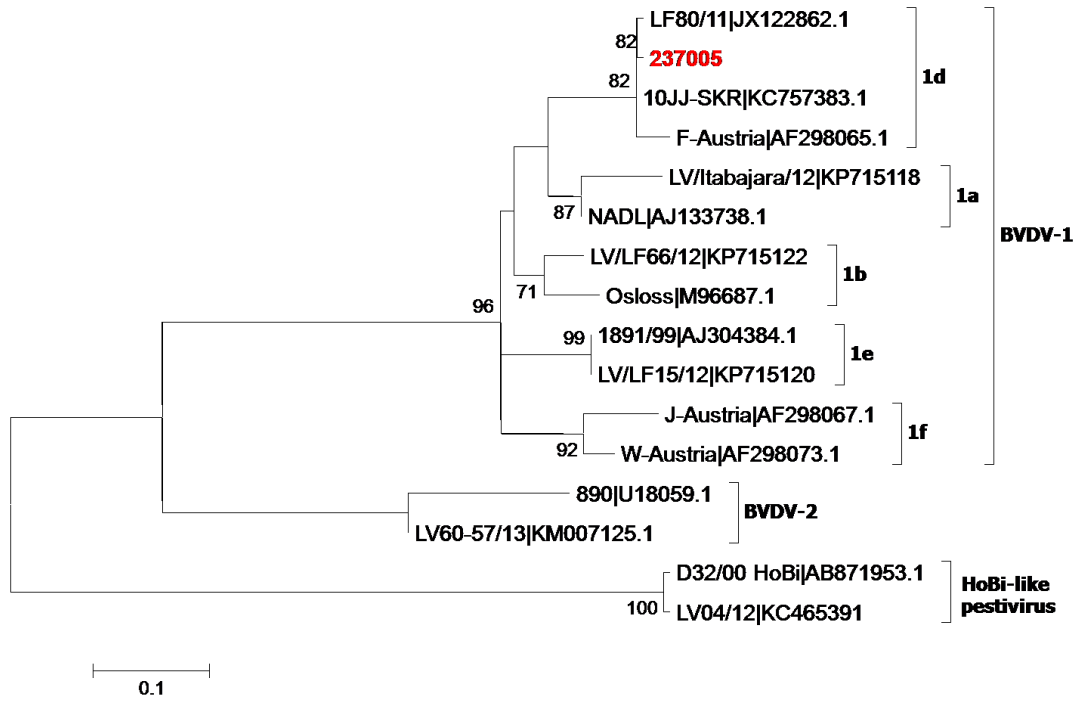
**Figure 1. Outbreak of atypical mucosal disease in calves by BVDV-1d.** **A. Calves, general body condition.** Severe sialorrhoea, progressive weight loss and emaciation. **B. Calf #2, interdigital skin.** Both thoracic and pelvic limbs showed focally extensive areas of ulceration. **C. Calf #2, oral mucosa.** Multifocal to coalescing areas of ulceration extending to mucocutaneous junction. **D. Calf #2, hard palate.** Multifocal areas of ulceration, extending to oral mucosa. **E. Calf #3, esophagus.** Multifocal severe linear ulcerations in mucosa covered by yellowish fibrillary material (fibrin). **F. Calf #2, abomasum.** Multifocal to coalescing ulcerations in the mucosa of the pyloric region.

**Figure 2. Outbreak of atypical mucosal disease in calves by BVDV-1d.** **A. Calf #2, oral mucosa,.** Severe necrosis in superficial epithelium, with numerous apoptotic cells, in addition to vacuolation of epithelial cells and severe diffuse parakeratotic hyperkeratosis; also, moderate inflammatory infiltrate of lymphocytes and plasma cells in mucosa-submucosa junction, 100x magnification, H&E. **B. Calf #2, skin.** Severe necrosis of epidermis, with multifocal hipereosinophilic apoptotic cells and vacuolated cells mostly in stratum spinosum and stratum corneum, besides intracorneal pustules and marked parakeratotic hyperkeratosis. H&E, 10x. **C. Calf #2, oral mucosa.** Marked immunostaining in cytoplasm of epithelial cells. IHC Anti-BVDV, 10x. **D. Eleven live calves (PIs), ear notch biopsy.** Marked immunostaining in keratinocytes of epidermis and follicular epithelium. IHC Anti-BVDV, 20x.

## Supplemental data

**Supplemental figure 1.** Phylogenetic tree based on the 5'UTR (a), N<sup>pro</sup> (b) sequences from BVDV-1d of one animal of the outbreak (**237005**) and reference strains. MEGA 6 was used for phylogeny inference according to a maximum likelihood algorithm. Bootstrap analyses that were supported by >70% of 1000 replicates are indicated in nodes. The bar represents genetic distance. The GenBank accession numbers of the reference strains are listed after the strain names and of the isolates from outbreak are: KU564959 and KU564979

Supplemental figure 1a.



Supplemental figure 1b.

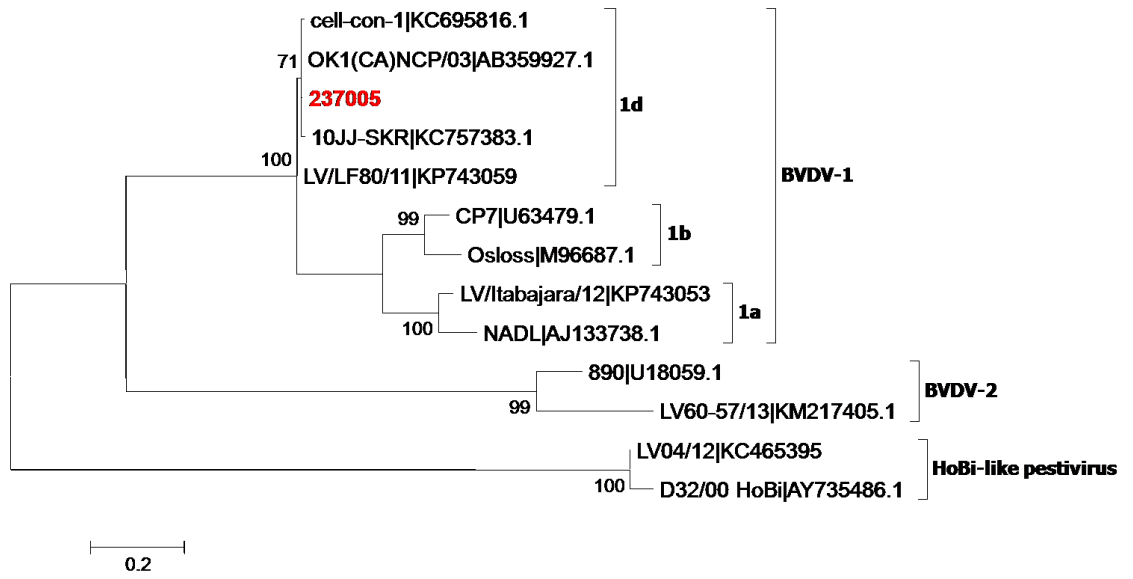
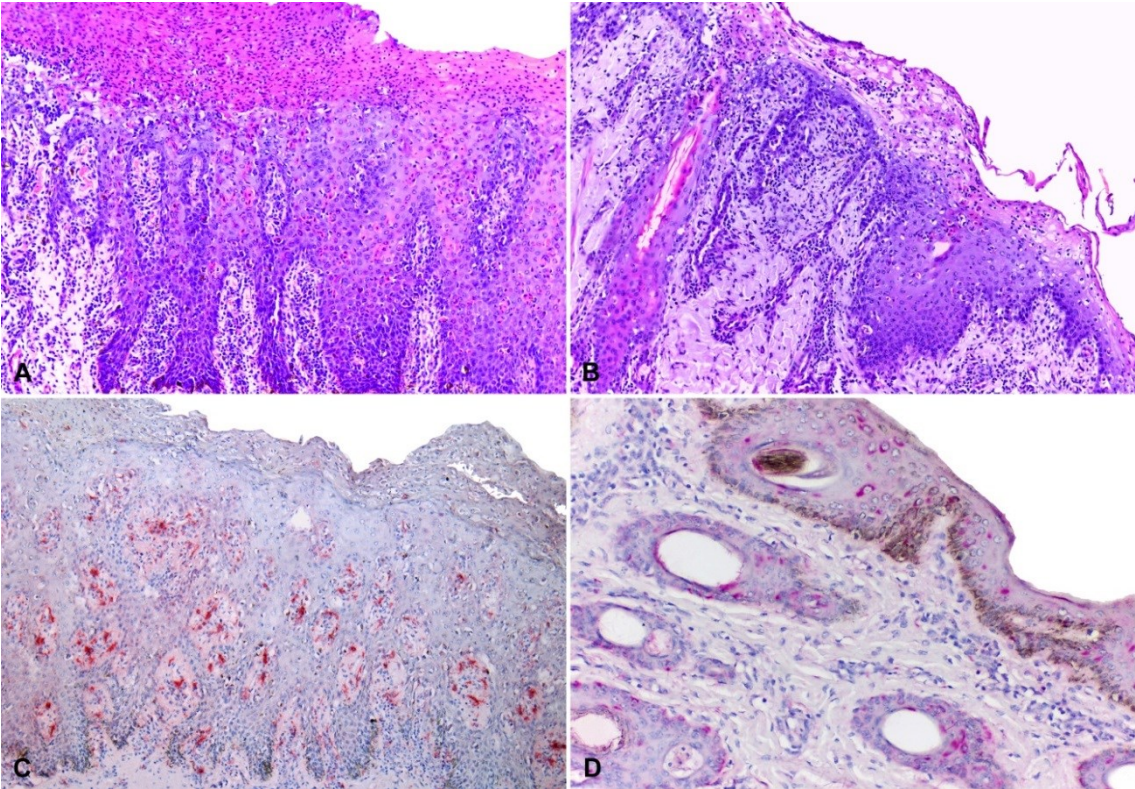


Figure 1.





Figure 2.





#### 4. FIGURAS ADICIONAIS



**Figura 1.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. Animal PI apresentando DM com dificuldade de ganho de peso e acentuada sialorréia.



**Figura 2.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro com DM atípica. Áreas multifocais ulceradas na mucosa oral, se estendendo à junção mucocutânea. A língua está com a superfície espessada e recoberta de forma multifocal a coalescente por um material fibrilar amarelado.



**Figura 3.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. A mucosa oral exibe úlcera focal recoberta por grande quantidade de fibrina. A língua está espessada de forma difusa e recoberta por fibrina, além de exibir áreas de ulceração.



**Figura 4.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. As papilas da mucosa oral estão difusamente atenuadas, arredondadas e avermelhadas.





**Figura 5.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro com DM atípica. A mucosa nasal exibe ulceração focalmente extensa recoberta por discreta quantidade de crostas.



**Figura 6.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2. Língua exibindo áreas multifocais de ulceração recobertas por fibrina.



**Figura 7.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #3. Rúmen com acentuado espessamento da mucosa por material amarelado friável, além de áreas multifocais de ulceração.

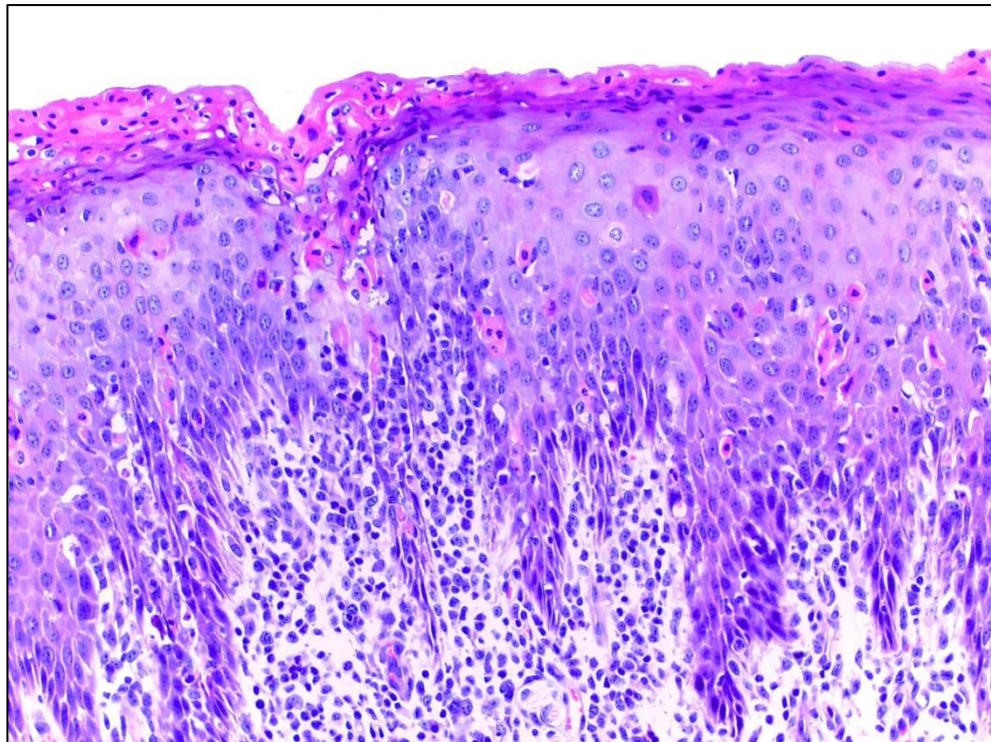


**Figura 8.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2. Rins exibindo áreas arredondadas multifocais brancacentas na superfície capsular.



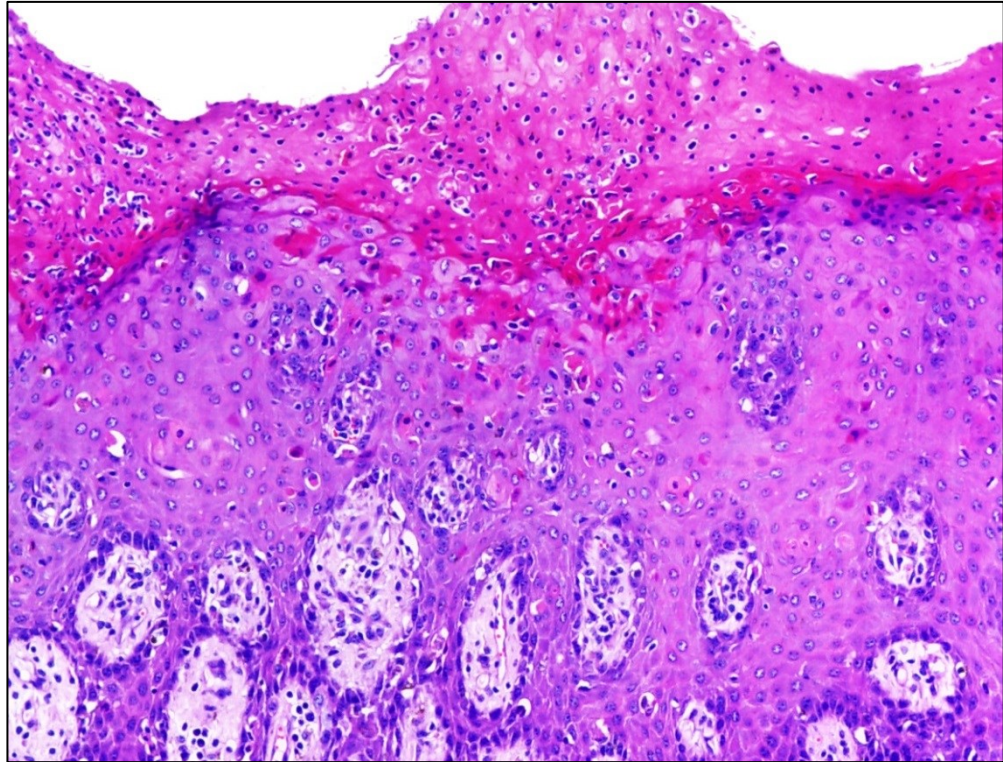


**Figura 9.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro com DM atípica. Área focalmente extensa de ulceração grave com aspecto vesicular em região interdigital.

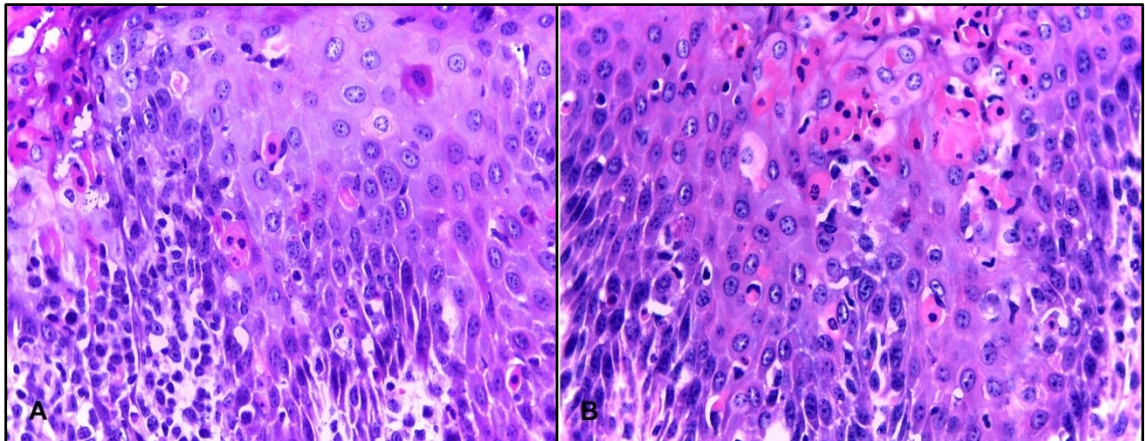


**Figura 10.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2, mucosa oral. Área focal de necrose do epitélio superficial, com numerosas células epiteliais apoptóticas hipereosinofílicas (observadas também no epitélio adjacente), além de vacuolização de células epiteliais basais, acentuado infiltrado inflamatório mononuclear de interface e hiperqueratose paraqueratótica na superfície. HE, 10x.

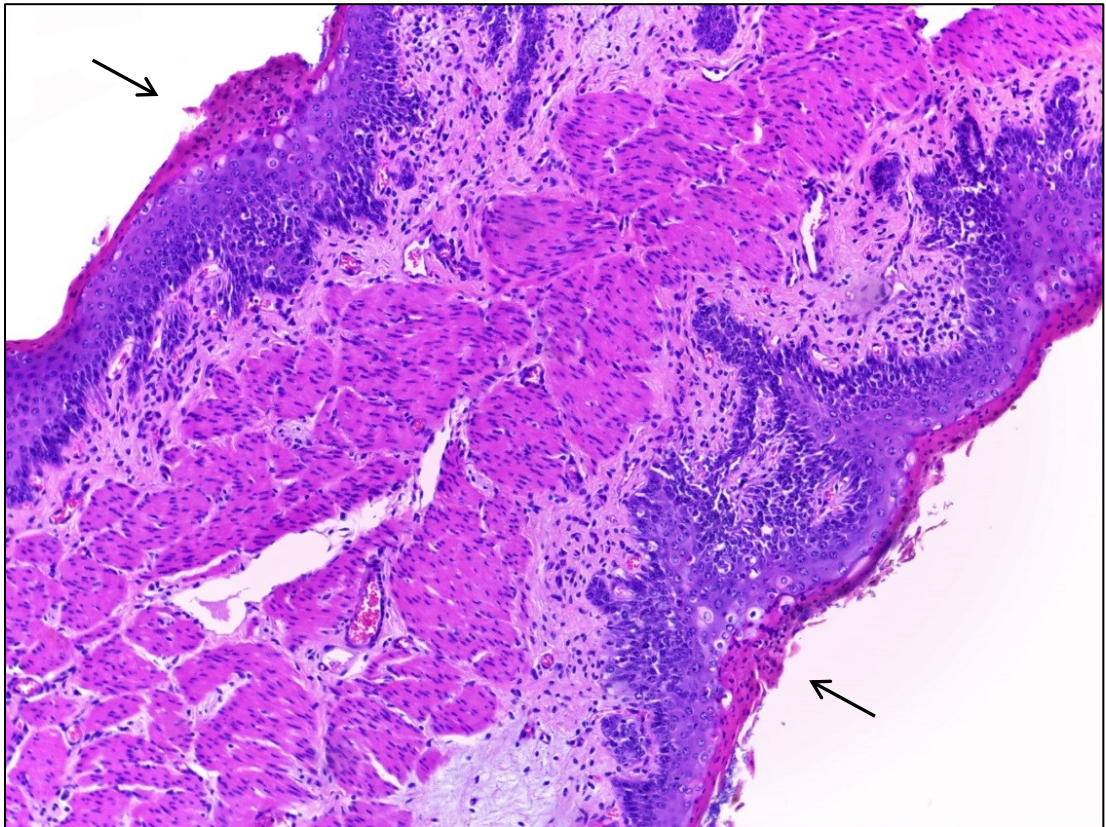




**Figura 11.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2, língua. Há de forma multifocal numerosas células epiteliais com citoplasma hipereosinofílico e núcleos picnóticos (células apoptóticas), além de acentuada hiperqueratose paraqueratótica. HE, 10x.

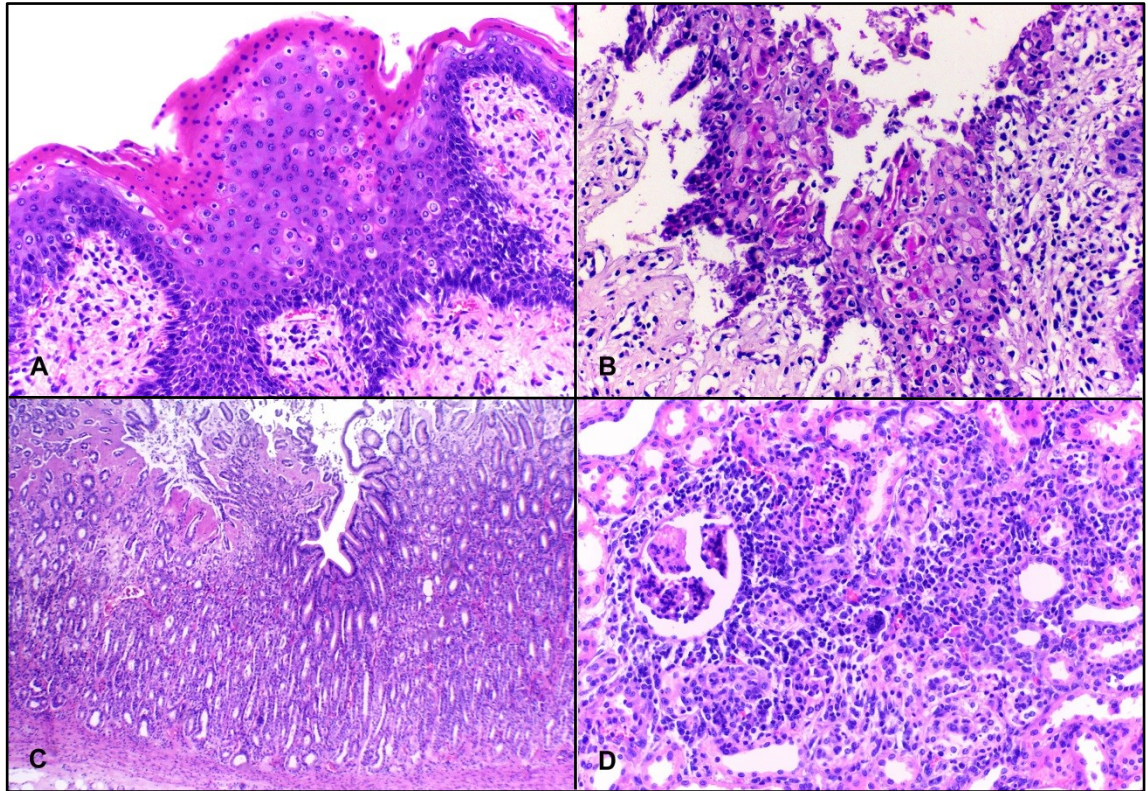


**Figura 12.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2. A. Mucosa oral. Área focal de necrose do epitélio com células apoptóticas e discreto infiltrado de neutrófilos (esquerda). No restante do epitélio há área focalmente extensa de vacuolização de células epiteliais basais com células apoptóticas no estrato espinhoso. HE, 40x. B. Língua. Inúmeras células apoptóticas no estrato espinhoso e discreta degeneração de células epiteliais. HE, 40x.



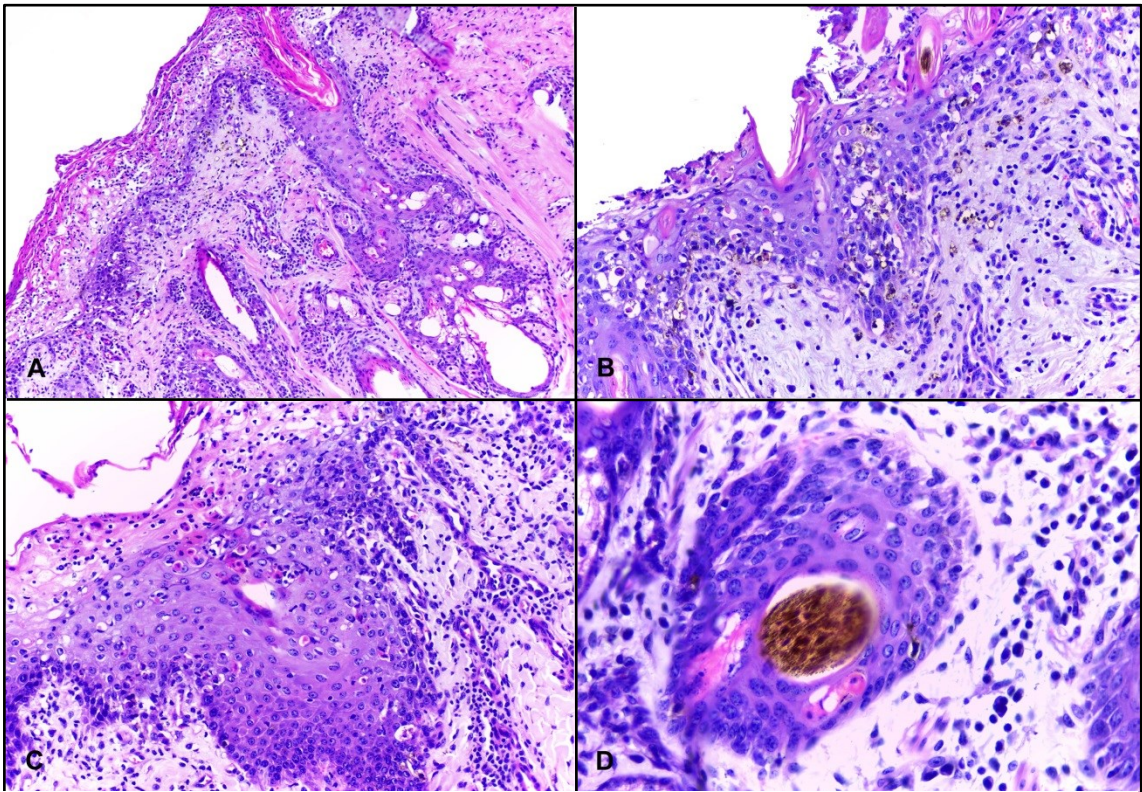
**Figura 13.** Surto de doença das mucosas atípica, bezerro #2, omaso. Áreas multifocais (setas) discretas com células epiteliais apoptóticas e vacuolização de células epiteliais. HE, 10x.



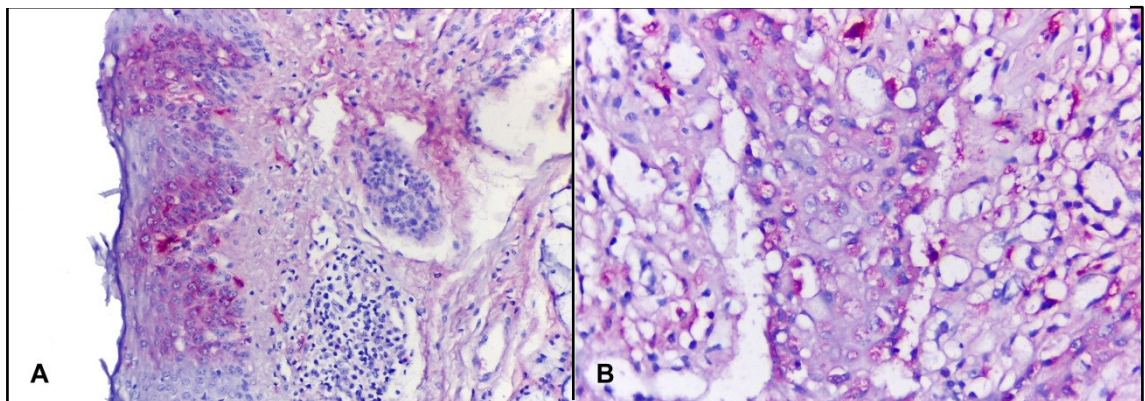


**Figura 14.** Surto de doença das mucosas atípica. **A.** Omaso, bezerro #2. Inúmeras células epiteliais hipereosinofílicas e picnóticas (apoptóticas) e vacuolização de células epiteliais. HE, 20x. **B.** Rúmen, bezerro #3. Desprendimento difuso do epitélio ruminal na junção mucosa-submucosa, com inúmeras células epiteliais apoptóticas e vacuolização de células epiteliais, além de moderado infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos em submucosa. HE, 20x. **C.** Abomaso, bezerro #2. Transição de área focalmente extensa de necrose da mucosa, caracterizada por debris amorfo eosinofílico. HE, 4x. **D.** Rim, bezerro #2. Infiltrado inflamatório multifocal intersticial discreto a moderado composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raras células gigantes multinucleadas de Langhans. HE, 20x





**Figura 15.** Surto de doença das mucosas atípica. **A.** Pele, bezerro #2. Necrose difusa acentuada da epiderme, com inúmeras células epiteliais apoptóticas e vacuolizadas em epiderme e epitélio folicular, pústulas intracorneais e acentuada hiperqueratose paraqueratótica, além de moderado infiltrado inflamatório mononuclear em derme superficial e perifolicular. HE, 10x. **B.** Pele, bezerro #2. Inúmeras células epiteliais com citoplasma hipereosinofílico e núcleos picnóticos, além de acentuada vacuolização de células epiteliais, discreto infiltrado inflamatório mononuclear em derme. HE, 20x. **C.** Pele, bezerro #2. Inúmeras células epiteliais apoptóticas e vacuolizadas em epiderme, além de múltiplas pústulas intracorneais e hiperqueratose paraqueratótica acentuada. HE, 20x. **D.** Pele, bezerro #2. Epitélio folicular ocasionalmente exhibe células apoptóticas, além de discreto infiltrado inflamatório mononuclear perifolicular. HE, 40x.



**Figura 16.** Surto de doença das mucosas atípica. **A.** Mucosa oral, bezerro #2. Intensa marcação intracitoplasmática em células epiteliais. IHQ anti-BVDV, 20x. **B.** Rúmen, bezerro #3. Moderada marcação intracitoplasmática em células epiteliais. IHQ anti-BVDV, 40x.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo confirmam a ocorrência do subgenótipo 1d de BVDV como causa de doença das mucosas atípica em bezerros no Rio Grande Sul.

As lesões foram predominantes em trato alimentar superior, principalmente em mucosa oral, e pele, em região interdigital, enquanto no trato alimentar inferior foram ausentes.

Lesões cutâneas generalizadas podem ser observadas ocasionalmente na forma aguda da MD atípica.

Um grande número de bezerros foi afetado, com um curso clínico rápido evoluindo para óbito.

Devem ser empregados métodos diagnósticos específicos para BVDV quando observada alta mortalidade de bezerros em um curto período de tempo, assim como deve ser realizado o diagnóstico diferencial de doenças vesiculares.

RT-PCR, isolamento viral e IHQ são métodos eficientes para diferenciar infecção aguda por BVDV e DM.

## REFERÊNCIAS

- BACHOFEN, C. *et al.* Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 258-267, 2010.
- BACHOFEN, C. *et al.* Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. **Veterinary Research**, v. 44, n. 32, p. 1-10, 2013.
- BAKER, J.A. *et al.* Virus diarrhea in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 15, p. 525-531, 1954.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 425-445, 1995.
- BAULE, C. *et al.* Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhea virus type I. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 146-153, 2001.
- BEDENICE, D. *et al.* Long-term clinicopathological characteristics of alpacas naturally infected with bovine viral diarrhea virus type Ib. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 605-612, 2011.
- BIANCHI, E. *et al.* Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 649-655, 2011.
- BIELEFELDT-OHMANN, H. Pathogenesis of bovine viral diarrhea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 5-10, 1983.
- BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v. 11, p. 447-476, 1995.
- BRODERSEN, B. W. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. **Veterinary Pathology**, v. 51, p. 453-464, 2014.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Veterinary Record**, v. 114, p. 535-536, 1984.
- BROWNLIE, J. *et al.* Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea infection of cattle. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 18, p. 157-166, 1987.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Research in Veterinary Science**, v. 46, p. 307-311, 1989.

- CARLSSON, U. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus, a cause of early pregnancy failure in the cow. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 36, p. 15-23, 1989.
- CARMAN, S. *et al.* Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 27-35, 1998.
- CASTRUCCI, G. *et al.* A study of immunologic relationships among serologically heterologous strains of bovine viral diarrhoea virus by cross immunity tests. **The Cornell Veterinarian**, v. 65, n.1, p. 65-72, 1975.
- CHARLESTON, B. *et al.* Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 8, p. 1893-1897, 2001.
- COLLETT, M.S. *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of pestivirus bovine viral diarrhoea virus. **Virology**, v. 165, p. 191-199, 1988.
- COLLINS, M.E. *et al.* Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. **Veterinary Microbiology**, v. 138, p. 289-296, 2009.
- CORNISH, T.E. *et al.* Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 110-117, 2005.
- CORRÊA, W.V.; NETO, L.Z.; BARROS, H.M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 35, n. 4, p. 141-151, 1968.
- CORTEZ, A. *et al.* Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006.
- DECARO, N. *et al.* Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from a diseased animal. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 1976-1983, 2012.
- DECARO, N. *et al.* Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-Like pestivirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 2946-2954, 2014.
- DENG, M. *et al.* Prevalence Study and Genetic Typing of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Four Bovine Species in China. **Plos One**, v. 10, n.4, e0121718, 2015.
- DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 8-13, 2013.
- DUNCAN, C. *et al.* Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 3, p. 289-296, 2008.

- EVERMANN, J.F.; RIDPATH, J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 129-139, 2002.
- FAIRBANKS, K.; SCHNACKEL, J.; CHASE, C.C. Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhoea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine**, v. 4, p. 24-34, 2003.
- FERREIRA, L.C.L. *et al.* Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 285-292, 2008.
- FLORES, E.F. *et al.* Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidences for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, p. 51-60, 2002.
- FLORES, E.F. *et al.* A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.
- FULTON, R.W. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV 1a, 1b and 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 35-40, 2005a.
- FULTON, R.W. *et al.* Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 3, p. 161-169, 2005b.
- GIVENS, M.D. *et al.* Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen after infection of seronegative, post-pubertal bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 428-434, 2003.
- GIVENS, M.D. *et al.* Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 42-51, 2009.
- GOENS, S.D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 12, p. 946-954, 2002.
- GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v. 20, p. 5-19, 2004.
- HANSEN, T.R. *et al.* Maternal and fetal response to fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, p. 295-306, 2010.
- HESSMAN, B.E. *et al.* Acute bovine viral diarrhoea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 397-404, 2012.

- HOUE, H. Economic impact of BVDV infections in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 137-143, 2003.
- JENCKEL, M. *et al.* Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. **Journal of Virology**, v. 88, p. 6983-6992, 2014.
- KANE, S.E. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus outbreak in a beef cow herd in South Dakota. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 246, n. 12, p. 1358-1362, 2015.
- LANYON, S.R. *et al.* Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v. 199, p. 201-209, 2014.
- LETELLIER, C. *et al.* Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 155-167, 1999.
- LIEBLER-TENORIO, E.M. *et al.* Comparative investigation of tissue alteration and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 163-174, 2000.
- LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.E.; NEILL, J.D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 388-396, 2004.
- LIMA, M.L. *et al.* Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 35-42, 2004.
- LUNARDI, M. *et al.* Outbreak of acute bovine diarrhoea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 599-604, 2008.
- MEYLING, A.; HOUE, H.; JENSEN, A.M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 9, p. 75-93, 1990.
- MOENNIG, V.; LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v. 11, p. 477-487, 1995.
- NETTLETON, P.F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 6, p. 615-642, 1995.
- NISKANEN, R. *et al.* Lack of transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 41, p. 93-99, 2000.



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

ODEÓN, A.C. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 133-144, 2003.

ODEÓN, A.C. *et al.* Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n.3, p. 221-228, 1999.

OLAFSON, P.; MAC, C.A.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 36, p. 205-313, 1946.

PELLERIN, C. *et al.* Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, p. 260-268, 1994.

PIZARRO-LUCERO, J. *et al.* Molecular characterization of pestivirus isolated from bovines in Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 208-217, 2006.

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

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. Differentiation of types 1a, 1b, and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, p. 101-106, 1998.

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

RIDPATH, J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105–121, 2010.

SANTOS, A.S. *et al.* Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarréia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 885-892, 2011.

SCHERER, C.F.C. *et al.* Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. **Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 285-299, 2001.

- SCHIRRMEIER, H. *et al.* Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3647-3652, 2004.
- SILVEIRA, S. *et al.* Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, doi:10.1111/tbed.12427, 2015.
- SIMMONDS, P. *et al.* Family *Flaviviridae*. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p. 1003–1020, 2011.
- SMITH, R.L. *et al.* Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhea virus in auction market cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 75-78, 2008.
- SPRECHER, D.J. *et al.* An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Theriogenology**, v. 36, p. 597-606, 1991.
- TAJIMA, M., *et al.* Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany. **Virus Research**, v. 76, p. 31-42, 2001.
- UZAL, F.A.; PLATTNER, B.L.; HOSTETTER, J.M. Alimentary System: Infectious and parasitic diseases of the alimentary tract. In: MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed., v. 2, cap. 1, p.117-140, Saint Louis: Elsevier, 2016.
- VILCEK, S. *et al.* Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 31-35, 2005.
- VILCEK, S. *et al.* Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v. 146, p. 99-115, 2001.
- VOGEL, F.S.F. *et al.* Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da Diarreia Viral Bovina. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 83-89, 2002.
- VOGES, H. *et al.* Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 165-175, 1998.
- VOGES, H.; YOUNG, S.; NASH, M. Direct adverse effects of persistent BVDv infection in dairy heifers – A retrospective case control study. **VetScript**, v. 19, p. 22-25, 2006.
- WEBER, M.N. *et al.* High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v. 191, p. 117-124, 2014.



WILHELMSEN, C.L. *et al.* Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 269-275, 1991.

YESILBAG, K. *et al.* Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 258-267, 2008.