

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE PESTIVÍRUS DE  
RUMINANTES EM BOVINOS DO NORTE E NORDESTE DO BRASIL**

LETÍCIA FERREIRA BAUMBACH

Porto Alegre, RS  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE PESTIVÍRUS DE  
RUMINANTES EM BOVINOS DO NORTE E NORDESTE DO BRASIL**

LETÍCIA FERREIRA BAUMBACH

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre, RS  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

---

**Cláudio Wageck Canal, Dr. (UFRGS)**  
(Orientador)

---

**Ana Paula Ravazzolo, Dr<sup>a</sup> (UFRGS)**  
(Membro da Banca)

---

**Fernando Vicosa Bauermann, Dr (Oklahoma State University)**  
(Membro da Banca)

---

**Helena Lage Ferreira, Dr<sup>a</sup> (USP)**  
(Membro da Banca)

---

**Franciele Maboni Siqueira, Dr<sup>a</sup> (UFRGS)**  
(Membro Suplente da Banca)

Porto Alegre, RS  
2021

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Esta pesquisa é parte integrante do projeto intitulado “Detecção e Caracterização Filogenética do Vírus da Diarreia Viral Bovina e Papilomavírus Bovino”, cadastrado na UFRGS sob o número 31976. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Veterinária, que possui nível de biossegurança NB-2, estando apto ao manuseio de vírus de classe 2, tais como os pestivírus de ruminantes, e no Centro de Biotecnologia (CBiot), ambos localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre/ RS. Para execução deste projeto, a aluna contou com bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001, além de recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço do fundo do meu coração todas as pessoas que tornaram esta jornada possível, não tenho palavras para expressar o tamanho da minha gratidão. No entanto, gostaria de dedicar este espaço aos pesquisadores do Brasil, que encontram ânimo para continuar trabalhando em situações tão adversas, como as que viemos enfrentando nos últimos tempos. Obrigada a todos que, apesar de tudo, continuam fazendo ciência de qualidade, pois só o conhecimento é capaz de permitir o crescimento de qualquer nação. Fazer ciência no Brasil é um ato de resistência!

RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Histórico .....	17
2.2 Taxonomia .....	18
2.2.1 Família <i>Flaviviridae</i> .....	18
2.2.2 Gênero <i>Pestivirus</i> .....	19
2.3 Organização genômica e replicação dos pestivírus.....	20
2.3.1 Genoma .....	20
2.3.2 Ciclo replicativo .....	23
2.4 Diversidade Genética, Antigênica e Biótipos .....	24
2.5 Epidemiologia dos Pestivírus de Ruminantes .....	27
2.5.1 Hospedeiros.....	27
2.5.2 Distribuição .....	28
2.5.3 Transmissão.....	29
2.6 Patogenia e Manifestações Clínicas .....	31
2.6.1 Infecções Transitórias.....	31
2.6.2 Infecção de Fêmeas Gestantes.....	32
2.6.3 Infecção Persistente .....	33
2.6.4 Doença das Mucosas (DM).....	35
2.6.5 Síndrome Hemorrágica .....	36
2.7 Diagnóstico.....	37
2.7.1 Isolamento Viral .....	39
2.7.2 Imunohistoquímica .....	40
2.7.3 RT-PCR e RT-qPCR.....	40
2.7.4 ELISA de Captura de Antígeno.....	42
2.7.4 Testes Sorológicos.....	42
2.7.4.1 Soroneutralização .....	42
2.7.4.2 ELISA .....	43
2.8 Prevenção e Controle .....	44
3. OBJETIVOS .....	53
3.1 Objetivo Geral .....	53

3.2 Objetivos Específicos .....	53
4. MANUSCRITO CIENTÍFICO .....	54
5. DISCUSSÃO GERAL.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
7. CURRICULUM VITAE .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

BVDV	Vírus da diarreia viral bovina ( <i>Bovine viral diarrhoea virus</i> )
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral ( <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal ( <i>World Organization for Animal Health</i> )
BVD	Diarreia viral bovina
BVDV-1	Vírus da diarreia viral bovina tipo 1
BVDV-2	Vírus da diarreia viral bovina tipo 2
BDV	Vírus da doença da fronteira
CSFV	Vírus da peste suína clássica
DRB	Complexo de doenças respiratórias dos bovinos
DM	Doença das mucosas
BVD	Diarreia viral bovina
HoBiPev	<i>HoBi-like Pestivirus</i>
SN	Soroneutralização
PI	Persistentemente Infectado
TI	Transitoriamente Infectado
ORF	Fase de leitura aberta ( <i>Open Reading Frame</i> )
CP	Citopático
NCP	Não citopático
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
NGS	Sequenciamento de alto rendimento
Npro	Autoprotease N terminal
E	Proteína Estrutural
NS	Proteína não estrutural
5'NCR	Região 5' não codificante (Non-coding region)
EUA	Estados Unidos da América
EU	União Europeia
HS	Síndrome hemorrágica
IHC	Imunohistoquímica
IPX	Imunoperoxidase
IF	Imunofluorescência
IRES	Sítio interno de entrada ribossomal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT	Transcriptase reversa
kb	Kilobase/ Quilobase
nm	Nanômetro



## RESUMO

A atividade agropecuária brasileira desempenha um importante papel na economia global e a bovinocultura tem sido um ponto estratégico para o desenvolvimento deste setor. Apesar de sua importância, o rebanho bovino brasileiro enfrenta grandes desafios sanitários. As doenças infectocontagiosas, principalmente as doenças virais, comprometem tanto a saúde quanto a produtividade dos animais. Os pestivírus de ruminantes são considerados agentes de grande importância na bovinocultura, em decorrência das perdas econômicas que causam em rebanhos de corte e leite em todo mundo. É fundamental monitorar a sanidade dos rebanhos e conhecer a epidemiologia dos agentes infecciosos para desenvolver programas de prevenção e controle eficientes. O gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*, apresenta três espécies com importância na bovinocultura: *Pestivirus A* (vírus da diarreia viral bovina 1, BVDV1), *Pestivirus B* (vírus da diarreia viral bovina 2, BVDV2) e *Pestivirus H* (HoBi-like pestivirus, HoBiPev). Essa variabilidade genética implica em desafios para detecção, prevenção e controle dos pestivírus nos rebanhos bovinos. Em algumas regiões brasileiras essa variabilidade genética já é bem descrita, como no Sul, sudeste e Centro-Oeste. Entretanto, faltam informações sobre a diversidade de pestivírus em regiões onde a bovinocultura, apesar de ser uma atividade recente, está em constante expansão e representa um alto impacto econômico, como nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Com o objetivo de aumentar os dados epidemiológicos e compreender a diversidade genética e antigênica dos pestivírus nestas Regiões, analisou-se o soro sanguíneo de 955 bovinos oriundos dos estados do Amazonas (AM), Amapá (AP), Pará (PA) e Roraima (RR). A presença de anticorpos foi investigada através da técnica de soroneutralização (SN) comparada contra o BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPev. No teste sorológico, 45% (177/390) das amostras foram positivas, ou seja, apresentaram anticorpos contra as cepas teste de BVDV. Dentre as amostras positivas, 37 (20,8%) apresentaram anticorpos neutralizantes para o HoBiPev, 35 (19,8%) para BVDV-1 e 25 (14,1%) para BVDV-2 e em 80 (45,2%) não foi possível determinar uma predominância de anticorpos contra as cepas teste. Os Pestivírus apresentam reatividade sorológica cruzada entre espécies e subgenótipos e em alguns casos não é possível determinar uma prevalência de títulos. Para detecção e caracterização dos pestivírus presentes nessas amostras, executou-se ensaios de RT-PCR seguidos de sequenciamento de Sanger e análise filogenética. Como resultado, três amostras foram positivas na técnica de RT-PCR e classificadas filogeneticamente como BVDV-1e (1) e HoBiPev (2). Os resultados

deste estudo reforçam a alta diversidade genética entre os isolados de pestivírus brasileiros e corrobora outras pesquisas que demonstram uma combinação única de pestivírus no Brasil, representando uma das maiores diversidades genéticas já descritas no mundo. Portanto, os resultados apresentados nesta dissertação somam novos conhecimentos acerca dos pestivírus circulantes na Região Norte e podem contribuir para embasar futuros programas de controle e erradicação de doenças causadas por pestivírus no País.

Palavra-chave: BVDV, HoBi-*like*, Vírus neutralização, Filogenia, Soroneutralização.

## **ABSTRACT**

*Brazilian agricultural activity plays an important role in the global economy and cattle raising has been a strategic point for the development of this sector. Despite its importance, the Brazilian cattle herd faces major sanitary challenges. Infectious-contagious diseases, especially viral diseases, compromise both the health and productivity of animals. Ruminant pestiviruses are currently considered agents of great importance in cattle farming, due to the economic losses they cause in beef and dairy herds worldwide. In view of this, it is essential to monitor the health of the herds and know the epidemiology of infectious agents to develop efficient prevention and control programs. The genus Pestivirus, family Flaviviridae, has three important species in cattle farming: Pestivirus A (bovine viral diarrhea virus 1, BVDV1), Pestivirus B (bovine viral diarrhea virus 2, BVDV2), and Pestivirus H (HoBi-like pestivirus, HoBiPev). This great genetic and antigenic variability poses challenges for the detection, prevention, and control of pestiviruses in cattle herds. In some regions of Brazil, this genetic variability is already well described, such as in the South and Southeast, however, there is a lack of information on the diversity of pestiviruses in regions where cattle raising is a recent activity, such as in the North Region of the country. In order to obtain Epidemiological data and understand the genetic and antigenic diversity of pestiviruses in this region, the blood serum of 955 cattle from the states of Amazonas (AM), Amapá (AP), Pará (PA), and Roraima (RR) was analyzed. We investigated the presence of antibodies, through serum neutralization (SN) assay compared against BVDV-1, BVDV-2, and HoBiPev. In serology, 45% (177/390) of the samples were positive, that is, they presented antibodies against the BVDV test strains. Among the positive samples, 37 (20.8%) had neutralizing antibodies against HoBiPev, 35 (19.8%) against BVDV-1, and 25 (14.1%) against BVDV-2. To detect and characterize the pestiviruses present in these samples, we performed RT-PCR assays followed by Sanger sequencing and phylogenetic analysis. As a result, three samples were RT-PCR positive and phylogenetically classified as subgenotype BVDV-1e and HoBiPev. This study reinforces the high genetic diversity among Brazilian pestivirus isolates and corroborates other studies that demonstrate a unique combination of pestiviruses in Brazil and that represent one of the greatest genetic diversities ever described in the world. Therefore, the results presented in this dissertation add new knowledge about the circulating pestiviruses in the North Region and may*

*contribute to support future programs for the control and eradication of diseases caused by pestiviruses in Brazil.*

*Keywords: BVDV, HoBi-like, Virus-neutralization, Phylogeny, Serum neutralization.*

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade agropecuária brasileira desempenha um importante papel na economia global e a bovinocultura tem sido um ponto estratégico para o desenvolvimento deste setor. Em 2020, o rebanho bovino brasileiro foi o maior do mundo, representando 14,3% do rebanho mundial. O país mantém a liderança como maior exportador e segundo maior produtor de carne bovina do mundo (USDA-FAS, 2020). A cadeia leiteira também merece destaque. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite e detém o segundo maior rebanho de vacas ordenhadas do mundo, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO-STAT, 2019).

Para manter o papel estratégico na promoção do desenvolvimento econômico, contribuir para a segurança alimentar e mitigar os impactos ambientais deste setor é necessário manter o rebanho bovino brasileiro saudável, objetivando alcançar o máximo de sua produtividade. Contudo, isso só é possível quando existe uma estrutura eficiente para o diagnóstico e informações adequadas sobre a epidemiologia, através do monitoramento constante dos animais (HOUE *et al.*, 1999). Além disso, o conhecimento das variantes virais que circulam em determinadas regiões é de extrema importância para elaboração de medidas de prevenção e controle que sejam eficazes. Apesar do Brasil estar nas primeiras posições nos *rankings* mundiais, o rebanho bovino brasileiro enfrenta grandes desafios sanitários. As doenças infectocontagiosas, principalmente as causadas por agentes virais, comprometem tanto a saúde quanto a produtividade dos animais, sendo uma preocupação constante nos programas de sanidade. Com cada vez mais países recebendo certificação de zona livre de febre aftosa (OIE, 2021), os pestivírus de ruminantes têm se tornado os vírus de maior importância para a bovinocultura mundial e causam grandes perdas econômicas em rebanhos de corte e leite em todo mundo (LANYON *et al.*, 2014; RICHTER *et al.*, 2017). O gênero *Pestivirus* pertence à família *Flaviviridae* e é composto por onze espécies virais reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) nomeadas de *Pestivirus A* a *K*. Cada espécie pode ainda ser dividida em inúmeros subgenótipos. Três espécies apresentam maior importância na bovinocultura: *Pestivirus A* (vírus da diarreia viral bovina 1, BVDV1), *Pestivirus B* (vírus da diarreia viral bovina 2, BVDV2) e *Pestivirus H* (HoBi-like pestivirus, HoBiPev) (ICTV, 2017; SIMMONDS *et al.*, 2017). Neste trabalho, para melhor compreensão e em concordância com a literatura atual, usaremos as abreviações BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV.

A diarreia viral bovina (BVD) faz parte da lista de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), juntamente com outras 117 doenças, infecções e infestações, que podem impactar tanto na saúde animal, quanto na saúde pública (OIE, 2020). Os pestivírus possuem a capacidade de infectar diversas espécies de mamíferos biungulados (ordem *Artiodactyla*) domésticos e silvestres, como ruminantes, javalis e suínos (SIMONDS *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2017). Os bovinos são hospedeiros naturais dos *Pestivirus A, B e H* (PINIOR *et al.*, 2017). Os sinais clínicos da infecção podem variar e a maior parte das infecções são transitórias e subclínicas. O BVDV infecta principalmente os tratos respiratórios, gastrointestinal e reprodutivo. Os distúrbios reprodutivos são os que causam maiores impactos na bovinocultura, aumentando as taxas de perdas gestacionais, defeitos congênitos e morte de animais jovens e, ainda, podendo ocasionar o nascimento de animais persistentemente infectados (PI), que mantêm e disseminam o vírus dentro dos rebanhos (HOUE *et al.*, 2003; RIDPATH; BAUERMAN; FLORES, 2017).

A bovinocultura no Brasil não é homogênea e em cada região predominam diferentes sistemas de criação, com densidade animal muito distinta, além da diferença de biomas em cada região. Na região Sul, as criações são mais extensivas e apresentam uma densidade animal menor. No Sudeste e Centro-Oeste as criações são mais intensivas, com o aumento da produção de gado em confinamento, resultando em uma alta densidade animal. As regiões Norte e Nordeste apresentam algumas peculiaridades, pois são criações mais extensivas e com pouca tecnologia envolvida. No Nordeste, os rebanhos podem ser mistos, tendo bovinos em contato com bubalinos e pequenos ruminantes como cabras e ovelhas (INPE- PRODES, 2020). A região Norte é uma área de pecuária recente e que se encontra em constante expansão. É uma região muito produtiva que detém 22% do rebanho nacional. Em 2019, o Brasil foi o segundo maior exportador de bovinos vivos do mundo e 66% desses animais são oriundos do estado do Pará, região Norte do Brasil. O Pará é o quinto maior produtor de gado do Brasil e o maior exportador de gado vivo do País, assentando a importância da região Norte na pecuária nacional (ANUALPEC, 2020).

No Brasil, o BVDV tem sido descrito desde o final de 1960 (CORREA *et al.*, 1968) e diversos estudos têm demonstrado uma ampla distribuição viral nos rebanhos brasileiros, além de uma alta variabilidade genética de acordo com diferentes regiões geográficas do País (CANAL *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2014a, 2014b; SILVEIRA *et al.*, 2017; 2018; BAUERMAN; RIDPATH, 2021). Esse cenário, único no

Brasil, representa uma das maiores diversidades genéticas já descritas mundialmente. Torna-se importante ressaltar que o Brasil possui diversos biomas, bem como diferentes sistemas de criação animal. Compreender a diversidade genética regional dos pestivírus de ruminantes é fundamental para o estabelecimento de protocolos de vacinação adequados que incluam as principais variantes virais circulantes no País, uma vez que a imunidade cruzada entre as diferentes espécies de pestivírus é limitada. Até o momento, nenhuma vacina comercial inclui o HoBiPeV e, atualmente, não há um programa oficial de controle e erradicação de pestivírus em bovinos no Brasil.

Contudo, cabe ressaltar que, por possuir uma alta diversidade genética e antigênica, o diagnóstico de BVDV exige certos cuidados. Os testes moleculares apresentam ótima sensibilidade e, quando acrescidos de sequenciamento genético, podem fornecer informações acerca de espécie e subgenótipo (SANDVIK *et al.*, 2004). Os testes sorológicos são excelentes para levantamentos epidemiológicos e monitoramento de rebanhos. A soroneutralização (SN) é considerada a técnica padrão ouro para detecção de anticorpos contra BVDV e, com o uso de cepas homólogas, é uma técnica muito específica (BRUM; WEIBLEN, 2017).

Com base em tais informações, o presente estudo tem como objetivo gerar dados epidemiológicos e compreender a diversidade genética e antigênica dos pestivírus na região Norte e Nordeste do Brasil, onde existe uma escassez de informações. Os resultados apresentados nesta dissertação acrescentam novas informações acerca dos pestivírus circulantes na região Norte e Nordeste, podendo contribuir para o desenvolvimento de futuros programas de controle e erradicação de doenças causadas por pestivírus no Brasil. Esta dissertação será introduzida por um referencial teórico e, posteriormente, apresentada na forma de manuscrito científico, que se encontra em fase de escrita e correção.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

O BVDV possui distribuição mundial, principalmente em países onde a bovinocultura ocorre de maneira expressiva (MOENNIG *et al.*, 2005). Em países livres de febre aftosa, o BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de inúmeros estudos e de programas de controle e/ou erradicação durante décadas. O primeiro relato de pestivírus em ruminantes data de 1946 e foi identificado em bovinos dos Estados Unidos. Foi descrita como uma doença transmissível, aguda, de baixa mortalidade, caracterizada por quadros de leucopenia, pirexia, depressão, diarreia, anorexia, lesões gastrointestinais e hemorragias (OLAFSON *et al.*, 1946). O isolamento viral foi realizado no ano de 1957 e o vírus foi nomeado como vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (LEE; GILLESPIE, 1957). Posteriormente, uma doença semelhante foi relatada no Canadá, no entanto era mais severa, apresentava baixa morbidade e alta mortalidade e recebeu o nome de doença das mucosas (DM) (CHILDS, 1946; RAMSEY; CHIVERS, 1953).

Em 1973 o gênero *Pestivirus* foi proposto para agrupar três espécies de vírus geneticamente similares: vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) (HORZINEK *et al.*, 1973). Um pouco mais tarde, análises filogenéticas de isolados de BVDV, revelaram a existência de dois grupos geneticamente distintos: BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). O BVDV-2 foi identificado no final da década de 80 na América do Norte, em surtos de BVD aguda e hemorrágica (CORAPI; FRENCH; DUBOVI, 1989). Ao transcorrer dos anos, o gênero *Pestivirus* passou por revisões taxonômicas e por décadas apenas quatro espécies virais eram oficialmente reconhecidas: BVDV-1, BVDV-2, CSFV e BDV. Essas espécies são atualmente classificadas como *Pestivirus A*, *B*, *C* e *D*. Após novas classificações e reclassificações, outros pestivírus emergentes foram sendo adicionados ao gênero. Atualmente, 11 espécies são reconhecidas pelo ICTV e as sete espécies recentemente classificadas são o *Pestivirus E* (*pronghorn antelope virus*), *Pestivirus F* (*porcine pestivirus*, *Bungowannah vírus*), *Pestivirus G* (*giraffe pestivirus*), *Pestivirus H* (*Hobi-like pestivirus*, *atypical ruminant pestivirus*), *Pestivirus I* (*Aydin-like pestivirus*, *sheep pestivirus*), *Pestivirus J* (*rat pestivirus*) e *Pestivirus K* (*atypical porcine pestivirus*) (SIMMONDS *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2017; ICTV, 2017).



No Brasil, o primeiro relato de BVDV é do final dos anos 1960 e descreveu a ocorrência de uma doença gastrointestinal, semelhante a DM identificada no Canadá em 1946 (OLAFSON *et al.*, 1946; CORREA *et al.*, 1968). Em 2004, o HoBi-like pestivirus (HoBiPeV) foi identificado pela primeira vez na Alemanha, em um lote de soro fetal bovino (SFB) oriundo do Brasil (SCHIRRMEIER *et al.*, 2004). Desde então, o HoBiPeV vem sendo reportado em países como Itália, China, Tailândia, Índia e Brasil (STAHL *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; DECARO *et al.*, 2011; BAUERMANN *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2018).

Os avanços no diagnóstico molecular, no sequenciamento genético e nos estudos de metagenômica, possibilitaram a identificação de novos agentes virais. No ano de 2005, um isolado antigo de HoBiPeV foi descrito em uma amostra de búfalo que havia sido coletada no final da década de 1990 no Brasil, demonstrando que o vírus já circulava no País anos antes de ser descrito pela primeira vez (CANAL, dados não publicados; STALDER *et al.*, 2005).

## **2.2 Taxonomia**

### **2.2.1 Família *Flaviviridae***

A família *Flaviviridae* é composta por vírus de importância em saúde humana e animal. Os membros dessa família possuem muitas características em comum, como estrutura e morfologia dos virions, organização do genoma, expressão gênica e replicação viral. No entanto, de acordo com as propriedades biológicas, ecológicas e moleculares, os membros da família *Flaviviridae* podem ser divididos atualmente em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (ICTV, 2020).

O gênero *Flavivirus* inclui 53 espécies e a maioria são vírus transmitidos por artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos. Mamíferos e pássaros são os hospedeiros primários e a infecção pode variar de assintomática à febre hemorrágica grave ou fatal com risco de comprometimento neurológico. Os vírus de importância para a saúde humana, no Brasil, incluem o vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV) e o zika vírus (ZIKV). Outros membros do gênero causam doenças economicamente importantes em animais domésticos e selvagens.

O gênero *Hepacivirus* inclui o vírus da hepatite C (HCV), um importante patógeno exclusivamente humano e agente etiológico da doença hepática crônica, incluindo cirrose e

câncer, podendo levar a morte. Outros vírus do gênero apresentam patogenicidade desconhecida e infectam equinos, roedores, morcegos, bovinos e primatas não humanos. Até o momento, o gênero *Hepacivirus* é composto por 14 espécies virais.

Por sua vez, membros do gênero *Pegivirus* estão associados a infecções persistentes em diversas espécies de mamíferos e ainda não foram claramente associados a doenças. Atualmente, o gênero conta com 11 espécies descritas.

Os vírus do gênero *Pestivirus* infectam mamíferos da ordem dos artiodáctilos, como suínos, javalis, ruminantes domésticos e selvagens. As infecções podem ser subclínicas ou causar desordens nos sistemas respiratório, gastrointestinal, imune e reprodutor. Atualmente o gênero conta com 11 espécies e a maioria apresenta grande impacto na saúde animal (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; SIMMONDS *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2017; ICTV, 2020).

### 2.2.2 Gênero *Pestivirus*

O gênero *Pestivirus* era oficialmente composto, até o ano de 2017, por quatro espécies reconhecidas pelo ICTV: vírus da diarreia viral bovina tipos 1 e 2 (BVDV-1, BVDV-2); vírus da peste suína clássica (CSFV), importantes patógenos de bovinos e suínos, respectivamente, estando presentes em todos os continentes; e o vírus da doença da fronteira (BDV), que infecta ovinos e possui importância limitada. Em 2018, a nomenclatura das espécies foi modificada e outras possíveis novas espécies já descritas foram adicionadas oficialmente ao gênero (SIMMONDS *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2017; ICTV, 2017). Desta maneira, BVDV -1, BVDV-2, CSFV e BDV foram renomeados para *Pestivirus A, B, C e D*, respectivamente. As novas espécies adicionadas ao gênero *Pestivirus* foram: *Pestivirus E* (VILCEK *et al.*, 2005a), *Pestivirus F* (KIRKLAND *et al.*, 2007), *Pestivirus G* (AVALOS-RAMIREZ *et al.*, 2001), *Pestivirus H* (SCHIRRMEIER *et al.*, 2004), *Pestivirus I* (OGUZOGLU *et al.*, 2009), *Pestivirus J* (FIRTH *et al.*, 2014) e *Pestivirus K* (HAUSE *et al.*, 2015). Essa nova classificação foi baseada na sequência de nucleotídeos do genoma viral completo. Com base nisso, duas novas prováveis espécies; um pestivírus descrito em morcego (WU *et al.*, 2012) e pestivírus descritos em pequenos ruminantes na Tunísia (THABTI *et al.*, 2005); não foram oficialmente reconhecidos como pertencentes ao gênero *Pestivirus* devido aos genomas estarem somente parcialmente sequenciados (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies do gênero *Pestivirus* de acordo com nova classificação aprovada pelo ICTV

Espécie	Nome do Vírus	Abreviatura
<i>Pestivirus A</i>	bovine viral diarrhea virus 1	BVDV1
<i>Pestivirus B</i>	bovine viral diarrhea virus 2	BVDV2
<i>Pestivirus C</i>	classical swine fever virus	CSFV
<i>Pestivirus D</i>	border disease virus	BDV
<i>Pestivirus E</i>	pronghorn antelope pestivirus	PAPeV
<i>Pestivirus F</i>	porcine pestivirus	PPeV
<i>Pestivirus G</i>	giraffe pestivirus	GPeV
<i>Pestivirus H</i>	HoBi-like pestivirus	HoBiPeV
<i>Pestivirus I</i>	aydin-like pestivirus	AydinPeV
<i>Pestivirus J</i>	rat pestivirus	RPeV
<i>Pestivirus K</i>	atypical porcine pestivirus	APPeV

Fonte: Elaborada pela autora com base em ICTV Online Report, 2017.

## 2.3 Organização genômica e replicação dos pestivírus

### 2.3.1 Genoma

O gênero *Pestivirus* pertence à família *Flaviviridae*. Seus membros possuem virions esféricos com diâmetro de aproximadamente 40-60 nm (LAUDE *et al.*, 1979). O nucleocapsídeo pode apresentar formato icosaédrico revestido por um envelope lipoproteico derivado das membranas da célula hospedeira. A infecciosidade do virion é instável em temperaturas acima de 40°C e a presença do envelope torna esses vírus suscetíveis à inativação por solventes orgânicos e detergentes (DEPNER *et al.*, 1992). Os pestivírus possuem maior resistência à inativação por pH baixo e, diferentemente de outros gêneros da família *Flaviviridae*, apresentam maior estabilidade em uma ampla faixa de pH.

O genoma dos pestivírus é constituído de uma fita simples de RNA, com polaridade positiva (+) ssRNA, possuindo entre 11,3 e 13,0 kilobases (kb). O genoma RNA apresenta duas regiões não codificantes (NCR- *Non-Coding Region*) nas extremidades 5' e 3' e possui uma única ORF (*Open Reading Frame*) (COLLETT *et al.*, 1988; BECHER *et al.*, 1998; 2014) que codifica uma poliproteína de cerca de 3.900 aminoácidos (TAUTZ *et al.*, 2015, ABBAS *et al.*, 2013). Essa poliproteína é clivada em onze ou doze proteínas à medida em que é traduzida, sendo quatro proteínas estruturais (E) - proteína do capsídeo (C) e

glicoproteínas do envelope ( $E^{ms}$ , E1 e E2) - e as demais não estruturais (NS) - proteína N ( $N^{pro}$ ), proteína 7 (p7), NS2-3, NS4A-B, NS5A-B (COLLETT *et al.*, 1988; MACLACHLAN, DUBOVI, 2011; TAUTZ *et al.*, 2015; SIMMONDS *et al.*, 2017). Os membros da família *Flaviviridae* não possuem estrutura *cap* na região 5' do seu genoma (DENG, RIBLET, 1993). Em outros microrganismos, essa estrutura tem função de interação com o ribossomo e sinalização para o início da tradução. A estratégia utilizada para garantir a tradução do RNA utilizando a maquinaria celular envolve a ligação dos ribossomos em uma estrutura secundária e terciária formada pelo RNA nessa região, denominada de sítio interno de entrada no ribossomo (IRES). Nesse sítio, ocorre a sinalização e o início da tradução (POOLE *et al.*, 1995). Por ser altamente conservada entre os diferentes pestivírus, sua sequência de nucleotídeos é utilizada nas análises filogenéticas (THURNER *et al.*, 2004).

Dentre as proteínas processadas, a primeira proteína viral traduzida é a proteína não estrutural  $N^{pro}$ , que possui atividade autoproteolítica responsável por sua própria liberação da poliproteína (STARK *et al.*, 1993). Sua função é relacionada ao bloqueio da produção de interferon tipo I (IFN) e já foi associada à habilidade dos pestivírus de gerar infecções persistentes em fetos (CHARLESTON *et al.*, 2001). A  $N^{pro}$  é encontrada somente nos pestivírus e não possui homologia com nenhuma outra protease. Esta proteína é altamente conservada e frequentemente usada em análises filogenéticas (RAWLINGS *et al.*, 2012; NEILL *et al.*, 2013). A proteína do capsídeo (C) reveste o RNA genômico protegendo-o dentro da partícula viral (MURRAY *et al.*, 2008).

A  $E^{ms}$ , uma das três glicoproteínas do envelope viral, possui atividade de RNase e é importante na imunodepressão do hospedeiro (KREY *et al.*, 2012, SCHNEIDER *et al.*, 1993). Essa proteína é secretada na forma solúvel pelas células infectadas e anticorpos gerados contra ela podem ser neutralizantes. Assim como a  $N^{pro}$ , a  $E^{ms}$  também só é encontrada nos *Pestivirus*, e da mesma forma está relacionada ao bloqueio da resposta IFN-1 do hospedeiro (SCHWEIZER; PETERHANS, 2001; RUGGLI *et al.*, 2005; HILTON *et al.*, 2006; MEYERS *et al.*, 2007; NEILL *et al.*, 2013; ZURCHER *et al.*, 2014; TAUTZ *et al.*, 2015).

A E1 e E2 são proteínas integrais da membrana. A proteína E1 forma heterodímeros com a proteína E2 (THIEL *et al.*, 1991). Esses heterodímeros são necessários para a entrada do vírus na célula e possuem função de ligação aos receptores celulares (LIU *et al.*, 2008).

Embora seja uma glicoproteína do envelope, os animais infectados podem produzir baixos títulos de anticorpos contra E1 e esta não é alvo importante para os linfócitos T (KIMMAN *et al.*, 1993). A glicoproteína E2 é a região genética e antigênica mais variável dos pestivírus, possuindo os principais epítomos antigênicos neutralizantes, sendo o antígeno imunodominante e o maior alvo da resposta imune humoral protetora (DEREGT *et al.*, 1998). Muitos anticorpos produzidos contra E2 são neutralizantes e efetivamente inibem a infecção. Além disso, a E2 media a ligação ao receptor celular CD46, distribuído em diversos tipos celulares, sendo o maior determinante de tropismo celular (DONIS; CORAPI; DUBOVI, 1988; LIANG *et al.*, 2003; RONECKER *et al.*, 2008).

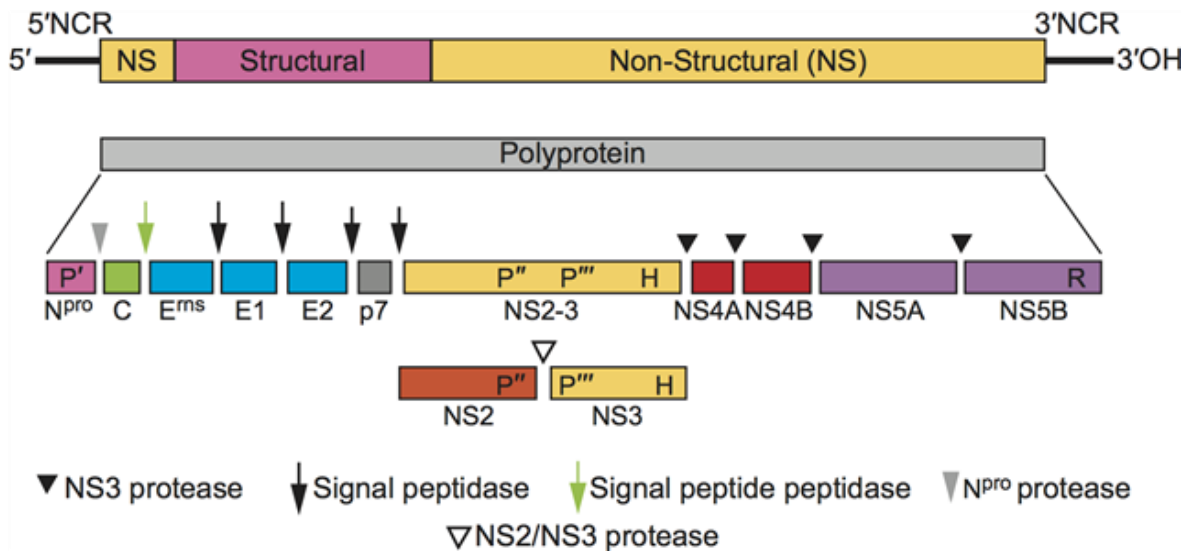
A proteína p7 é necessária para a patogenicidade viral e importante na montagem e dispersão das partículas virais, facilitando a migração do vírus entre as células do hospedeiro (GLADUE *et al.*, 2012).

A proteína NS2 induz um estresse no retículo endoplasmático da célula hospedeira e desempenha um papel importante na patogênese e na virulência (GUO *et al.*, 2011). Ela é encontrada fusionada com a NS3 em células infectadas com cepas não citopáticas (NCP), porém é encontrada na forma individualizada em grande quantidade em infecção por cepas citopáticas (CP). A clivagem entre NS2 e NS3 é processada pela própria NS2, havendo a necessidade de interação com uma chaperona celular denominada Jiv (domínio J interagindo com a proteína viral) (LACKNER; THIEL; TAUTZ, 2006). Acredita-se, portanto, que este controle da atividade de protease e clivagem entre NS2 e NS3 através da limitação na quantidade de Jiv celular pode ser um importante fator regulatório do vírus (RINCK *et al.*, 2001), uma vez que a habilidade de estabelecer infecções persistentes depois da exposição intrauterina é restrita ao biótipo NCP, onde estas duas proteínas permanecem na forma não clivada. Quando este fator regulatório é perdido, seja pela quantidade de Jiv celular expressada em excesso ou quando um fragmento dessa chaperona é inserido no genoma de cepas de pestivírus, ocorre a indução da clivagem entre NS2-3 em alta eficiência. Esse e outros casos de inserções no genoma de cepas CP, principalmente entre NS2 e NS3, são capazes de induzir um quadro fatal denominado Doença das Mucosas (DM) em bovinos persistentemente infectados (PETERHANS *et al.*, 2010).

A clivagem das outras proteínas não estruturais ocorre em quatro sítios de clivagem (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B). A proteína NS4A é um cofator da NS3 (BAZAN; FLETTERICKT, 1988). As proteínas NS4B, NS5A e NS5B são

componentes do complexo de replicação viral. Além disso, a NS4B está envolvida no rearranjo da membrana celular na célula infectada. A NS5A está relacionada à tradução das proteínas e montagem do virion por meio da interação entre as proteínas virais e do hospedeiro (LING *et al.*, 2018). A NS5B tem função de RNA polimerase e está envolvida na montagem das partículas virais (ANSARI *et al.*, 2004; WEISKIRCHER *et al.*, 2009).

Figura 1. Organização esquemática do genoma dos pestivírus e o processamento das proteínas estruturais e não estruturais



Fonte: TAUTZ *et al.*, 2015.

### 2.3.2 Ciclo replicativo

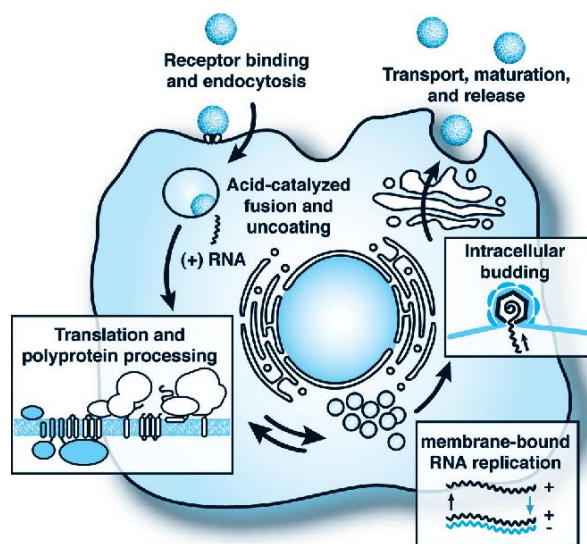
A replicação do genoma e a produção da progênie viral ocorrem no citoplasma da célula hospedeira. A fixação à célula hospedeira parece ser mediada por receptores envolvendo mais de uma molécula de superfície celular e as glicoproteínas virais E<sup>ms</sup> e E2. Foi demonstrado que o CD46 bovino, uma proteína de membrana reguladora da atividade do complemento, funciona como um correceptor celular para o BVDV (MAURER *et al.*, 2004; KREY *et al.*, 2006).

Após a interação entre as proteínas do envelope viral e os receptores da membrana plasmática, o vírus é internalizado por endocitose. Seguidamente a penetração, os vírus iniciam a replicação no citoplasma, interrompendo parcialmente as funções de transcrição e tradução da célula hospedeira (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Uma vez no interior da

célula, o vírus é transportado até os endossomos, onde há uma acidificação do meio, provocando a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo. Com a fusão das membranas, o capsídeo dissocia-se (desnudamento) e o genoma viral é liberado no citoplasma, onde ocorrerá a transcrição e a tradução (Figura 2).

Na replicação, ocorre a síntese de um RNA complementar de sentido negativo (antigenômico) que serve como um molde para a síntese do RNA genômico. Já o RNA de sentido positivo é traduzido em uma poliproteína que é auto clivada e forma as proteínas estruturais e não-estruturais. A morfogênese das novas partículas virais ocorre na região perinuclear do citoplasma, em associação com as membranas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático liso. As partículas recém-formadas aparecem em vacúolos no citoplasma e a sua liberação ocorre pela fusão dessas vesículas com a membrana plasmática. A ruptura da célula não é um pré-requisito para a liberação dos virions, podendo ocorrer ou não dependendo do biótipo envolvido (CP ou NCP) (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SIMMONDS *et al.*, 2011; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; NEILL *et al.*, 2013).

Figura 2: Representação esquemática do ciclo de replicação viral da família *Flaviviridae*



Fonte: LINDENBACH *et al.*, 2007.

## 2.4 Diversidade Genética, Antigênica e Biótipos

Os pestivírus apresentam grande variabilidade genética e antigênica (NEILL *et al.*, 2013). Além da classificação por espécies os pestivírus de ruminantes podem ser divididos

em subgenótipos: o BVDV-1 apresenta até o momento 21 subgenótipos (1a- 1u) descritos (VILCEK *et al.*, 2001; DENG *et al.*, 2012); o BVDV-2 apresenta três subgenótipos (2a- 2c) (FLORES *et al.*, 2002; JENCKEL *et al.*, 2014; YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017) e o HoBi-Like apresenta cinco subgenótipos (a-e) identificados atualmente (GIAMMARIOLI *et al.*, 2015; SIMMONDS *et al.*, 2017; KALAIYARASU *et al.*, 2021).

Os critérios de classificação utilizados pelo ICTV baseiam-se na análise filogenética de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, na relação antigênica e de reatividade cruzada e no hospedeiro de origem (SMITH *et al.*, 2017; ICTV, 2020). Compreender e identificar essas variações é importante para inferir a história evolutiva e epidemiológica viral, para rastrear a origem de surtos e fornecer bases para uma abordagem padronizada de classificação (VILCEK *et al.*, 2001). No caso dos pestivírus, a similaridade entre as sequências de nucleotídeos é o critério mais seguro para diferenciação das espécies. As análises filogenéticas utilizam principalmente a região 5'NCR para a detecção e caracterização de variações no genoma, uma vez que apresenta segmentos altamente conservados. A glicoproteína E2 é a região genética e antigênica mais variável dos pestivírus e a proteína não estrutural N<sup>pro</sup> é única desse gênero, sendo muito utilizadas para comparação e caracterização dos isolados dentro dos subgenótipos (VILČEK *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2010; BOOTH *et al.*, 2013; PECORA *et al.*, 2015).

Além dessa diversidade genética, os pestivírus são antigenicamente relacionados e apresentam reatividade sorológica cruzada (SIMMONDS *et al.*, 2011). No entanto, os títulos de anticorpos neutralizantes no soro de animais previamente expostos são geralmente médios a altos frente à espécie homóloga e baixos ou não reativos frente às demais espécies; ou seja, a reatividade sorológica cruzada entre as espécies de pestivírus é baixa e pode ser bastante variável também entre os subgenótipos e genótipos, e inclusive entre cepas de um mesmo grupo genético. Além disso, foi verificado que o BVDV-1 e 2 são mais parecidos antigenicamente entre si do que com HoBiPeV (BECHER *et al.*, 2003; BACHOFEN *et al.*, 2008; RIDPATH *et al.*, 2010; GIAMMARIOLI *et al.*, 2011; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; PECORA *et al.*, 2014; BAUERMANN *et al.*, 2017, EVANS *et al.*, 2019).

As variações genéticas observadas nos *Pestivirus* resultam em baixa reatividade sorológica cruzada, que é evidenciada por falhas vacinais em animais imunizados com vacinas contendo cepas de BVDV-1 e que não foram eficazes em evitar a infecção experimental com cepas de BVDV-2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994), além da perda



de habilidade de detecção dos testes laboratoriais (FULTON *et al.*, 2003; BACHOFEN *et al.*, 2008; GIAMMARIOLI *et al.*, 2015). O conhecimento gerado acerca da diversidade dos pestivírus é importante para determinar relações evolutivas entre as cepas, possíveis fontes de infecção, no estabelecimento de programas de controle e para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e vacinas mais eficazes (BOOTH *et al.*, 2013; EVANS *et al.*, 2019).

Os pestivírus caracterizam-se por apresentar dois biótipos diferentes, baseados no efeito da replicação em cultivo celular. O biótipo CP causa danos nas células do cultivo, como vacuolização citoplasmática e morte celular (RIDPATH JF; BAUERMANN FV; FLORES, 2017). Os vírus CP são raros, isolados quase que exclusivamente de animais com a DM (BROWNLIE *et al.*, 1984) e são incapazes de estabelecer infecção fetal persistente (BROWNLIE *et al.*, 1989). O biótipo CP origina-se em animais PI a partir do vírus NCP original, através de mutações, deleções e rearranjos genéticos mais frequentemente encontrados na proteína viral não estrutural NS2-3, que passa a ser expressa sob a forma de duas proteínas: NS2 e NS3 (Figura 3) (POCOCK *et al.*, 1987).

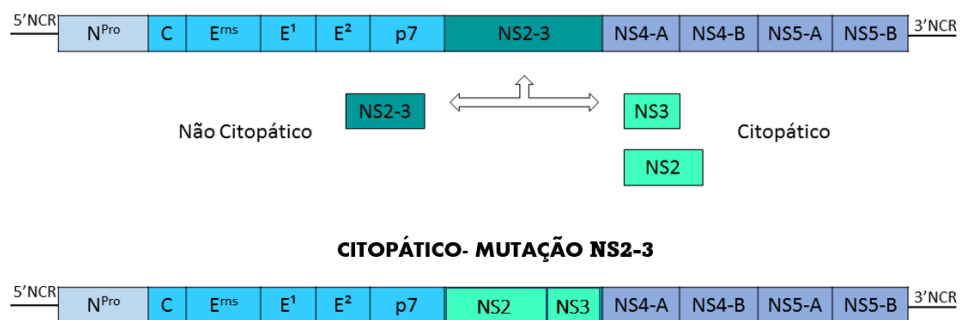
Diversas mudanças no genoma foram relatadas como formas de geração da NS2 e NS3 individuais, como inserções de fragmentos do genoma do hospedeiro, como a sequência Jiv (BECHER; TAUTZ, 2011), deleções ou duplicações de sequências do próprio genoma (MEYERS *et al.*, 1992; TAUTZ *et al.*, 1996), mutações pontuais (KUMMERER; MEYERS, 2000) ou rearranjos dentro do genoma (MEYERS *et al.*, 1992). Ambos os biótipos possuem a proteína NS2-3, contudo somente nos vírus citopáticos esta proteína é clivada e gera a proteína NS2 e NS3 (TAUTZ *et al.*, 1994). Essa alteração de proteína origina uma enfermidade gastrointestinal invariavelmente fatal, denominada DM (BAKER *et al.*, 1995; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011) (Figura 3).

Cabe ressaltar que há descrição de inserções em outras regiões do genoma de pestivírus que não na NS2-3 (BECHER; TAUTZ, 2011). Além disso, uma superinfecção com vírus CP, a partir de vacinas vivas modificadas ou de animais doentes, também pode levar o animal a desenvolver DM, através de uma possibilidade de recombinação, onde o mesmo animal pode apresentar os dois biótipos virais (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Em contraste, os vírus NCP expressam apenas a proteína precursora na sua forma fusionada NS2-3. Embora o papel da NS3 na citopatogenicidade ainda não esteja esclarecido, essa proteína é considerada o marcador molecular dos BVDV CP. As cepas

virais NCP são mais frequentes na natureza, sendo a maioria dos isolados de campo. Apresentam a capacidade de replicação nas células do hospedeiro sem causarem destruição celular. Podem atravessar a barreira transplacentária e causar infecção fetal, resultando no nascimento de animais persistentemente infectados (PI), sendo essa uma das características mais importantes dos pestivírus (FRAY *et al.*, 2000).

Figura 3. Esquema representativo do genoma do BVDV demonstrando como ocorre a alteração do biótipo NCP para CP



Fonte: Elaborado pela autora. Adaptado de RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017.

## 2.5 Epidemiologia dos Pestivírus de Ruminantes

### 2.5.1 Hospedeiros

Inicialmente, a classificação dos pestivírus era baseada no hospedeiro de origem, porém essa classificação tornou-se inapropriada. Infecções naturais por pestivírus já foram descritas em inúmeras espécies animais, uma vez que os pestivírus não são espécie-específicos. Os bovinos são os hospedeiros naturais para o BVDV e HoBiPeV e atuam como grandes mantenedores e disseminadores do vírus na natureza (SIMMONDS *et al.*, 2011). No entanto, infecções por BVDV já foram relatadas em espécies domésticas e selvagens da ordem *Artiodactyla*, classe *Mammalia*, como alpacas, búfalos, cervos, camelos, javalis, suínos, ovinos e caprinos (RIDPATH *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2013; TAO *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2016). Infecções naturais por HoBiPeV já foram descritas em bovinos, búfalos, ovinos e caprinos. Experimentalmente demonstrou-se que suínos podem ser infectados e excretar o vírus. Entretanto, caprinos e suínos parecem ser mais resistentes quando comparados a bovinos e ovinos (BACHOFEN *et al.*, 2013). Os pestivírus podem disseminar-se entre animais domésticos e silvestres; entretanto, a relevância epidemiológica desses achados permanece incerta (PASSLER; WALZ, 2010).

### 2.5.2 Distribuição

A BVD é uma doença infecciosa que está amplamente disseminada na população bovina global e, na ausência de programas de controle, é endêmica na maioria dos países onde há um número expressivo de animais, como em países europeus, norte-americanos, sul-americanos e asiáticos (BECHER *et al.*, 2003; SCHARNBOCK *et al.*, 2018).

A disseminação de cada um dos três pestivírus nas populações de bovinos tem se mostrado dependente da localização geográfica (BAUERMANN *et al.*, 2012). Tanto o BVDV-1 quanto o BVDV-2 foram identificados como mais dispersos geograficamente do que o HoBiPeV e podem ser encontrados em todos os continentes que possuem rebanhos de ruminantes domésticos ou selvagens (VILCEK *et al.*, 2006). Na Alemanha, mais de 90% das cepas de BVDV circulantes são BVDV-1 (JENCKEL *et al.*, 2014) e em países como Áustria (VILCEK *et al.*, 2001), Espanha, Reino Unido (VILCEK *et al.*, 2005b), Suíça (BACHOFEN *et al.*, 2010) e em praticamente toda a Europa o percentual de BVDV-1 circulante se mantém alto, quando comparado ao BVDV-2, embora surtos recentes sugiram que o BVDV-2 seja uma ameaça viral emergente na UE.

Na Austrália e na Índia, o genótipo predominante também é o BVDV-1. Na América do Norte existe uma prevalência uniforme de BVDV tipos 1 e 2, onde o BVDV-2 é responsável por cerca de pouco mais de 50% das infecções. No Chile há predominância de BVDV-1 (DONOSO *et al.*, 2018), assim como no México (GOMEZ-ROMERO *et al.*, 2017), Uruguai (MAYA *et al.*, 2016) e Argentina (PECORA *et al.*, 2014; SPETTER *et al.*, 2021). No entanto, a prevalência de BVDV-2 circulante na América do Sul é maior do que a reportada na Europa, Ásia e Austrália. Com base nesses dados, 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 similares de BVDV circulantes (WEBER *et al.*, 2014b).

O BVDV tem sido descrito no Brasil desde o final dos anos 1960 (CORREA; NETO; BARROS, 1968) e há uma ampla distribuição da infecção nos rebanhos brasileiros, com índices de soropositividade variando entre 18 e 90% (CANAL *et al.*, 1998; FLORES *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2006; QUINCOZES *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010). Quanto as espécies de pestivírus detectadas em ruminantes no País, o BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV têm sido frequentemente relatados em diversas regiões. A partir dos anos 1990, houve um predomínio de isolados do genótipo 1 (FLORES *et al.*, 2005). Porém, atualmente parece

estar havendo um equilíbrio no número de isolados entre os genótipos 1 e 2 e um aumento crescente na identificação de isolados HoBiPeV (CORTEZ *et al.*, 2006; BIANCHI *et al.*, 2011; WEBER *et al.*, 2014a, 2016; OTONEL *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2017; 2018).

O BVDV já foi isolado de diversas origens, incluindo soro fetal comercial, fetos abortados, animais PI, animais com DM, com doença respiratória, com doença gastrointestinal e rebanhos com problemas reprodutivos. Nos últimos anos, os relatos do isolamento de HoBiPeV de soro fetal e de casos clínicos também foram descritos. A identificação e a caracterização do primeiro isolado de HoBiPeV ocorreu na Alemanha em 2004, como contaminante em uma amostra de soro fetal bovino (SFB) comercial de origem brasileira (SCHIRRMIEIER *et al.*, 2004). Um estudo posterior demonstrou a presença de um pestivírus geneticamente semelhante causando mortalidade de búfalos no Brasil em 1966 (STALDER *et al.*, 2005).

Atualmente, o HoBiPeV encontra-se distribuído pela América do Sul, sudoeste asiático, Índia e em algumas regiões da Itália (STAHL *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; DECARO *et al.*, 2011; BAUERMANN *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2018). Apesar de sua crescente detecção em rebanhos brasileiros, informações acerca da prevalência nas diferentes regiões do País ainda são escassas, devido às dificuldades de diferenciação entre outros pestivírus de ruminantes, em especial as espécies de BVDV.

No estado do Rio Grande do Sul (RS), Weber *et al.* (2014) descreveram uma prevalência de 57,6% para BVDV-1 e 42,4% para BVDV-2 por RT-PCR. Em um estudo mais recente, observou-se predominância de BVDV-1a (35,9%) e BVDV-2b (31,4%) (SILVEIRA *et al.*, 2017). No Nordeste do Brasil, há uma alta prevalência de HoBiPeV nos rebanhos da região. Em um estudo realizado por SILVEIRA *et al.* (2018), todas as amostras RT-PCR positivas foram classificadas como HoBiPeV, baseado nos resultados de análises filogenéticas. Esses estudos reforçam a alta diversidade genética entre os isolados brasileiros.

### 2.5.3 Transmissão

O BVDV pode ser transmitido entre animais de diversas formas, sendo o contato direto a principal forma de contágio. A transmissão também pode ocorrer por contato indireto, via iatrogênica ou através de sêmen contaminado. A transmissão vertical é uma consequência

frequente da infecção em fêmeas gestantes (HOUE *et al.*, 1999; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

A transmissão direta pode ocorrer através do contato entre focinho-focinho, focinho-mucosa, mucosa-mucosa. Por outro lado, a transmissão indireta ocorre através de fluídos corporais, como secreção nasal, urina, leite, sêmen, saliva e secreção ocular. O contato com fetos abortados, fluídos fetais e anexos embrionários também podem predispor à infecção viral (MEYLING; HOUE; JENSEN, 1990). A transmissão iatrogênica ocorre quando há o compartilhamento de materiais contaminados, como agulhas, luvas de palpação, material cirúrgico, tatuadores, aplicadores de brinco e aplicadores de sêmen. O vírus também pode ser transmitido através do sêmen e embriões contaminados (BAKER *et al.*, 1987; BIELANSKI *et al.*, 2009). O BVDV sobrevive à criopreservação e processamento do sêmen para inseminação artificial e o uso de biotécnicas de reprodução não anula a possibilidade de transmissão do vírus (GIVENS *et al.*, 2009).

Existe uma forma de infecção persistente localizada no testículo de touros não virêmicos, com sorologia positiva 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, cuja transmissão pode ocorrer em até cinco meses após a infecção inicial e perdurar por até 2,7 anos (GIVENS *et al.*, 2003; 2009). A significância epidemiológica da infecção prolongada testicular é limitada devido à dificuldade de transmissão por monta natural ou inseminação artificial, devido à baixa carga viral nesses animais. Sabe-se que as maiores perdas relacionadas ao BVDV estão diretamente ligadas a problemas reprodutivos (GIVENS *et al.*, 2009).

A transmissão vertical (mãe-embrião/feto) acontece em animais infectados durante a gestação (HOUE *et al.*, 1999). Como os animais PI são reservatórios virais durante toda a vida, tornam-se importantes fontes de contaminação dos rebanhos (BAKER *et al.*, 1987; DEREGT; LOEWEN, 1995).

A entrada do BVDV no rebanho pode ocorrer através da introdução de animais PI, via outros ruminantes, como ovinos e caprinos, através de fêmeas gestando fetos PI, sêmen contaminado, transferência de embriões, materiais contaminados e de animais transitoriamente infectados (TI) (BAKER *et al.*, 1987; HOUE *et al.*, 1999). Entretanto, animais TI são tidos como maus transmissores, por excretarem baixos títulos virais. Nesses animais, o período de incubação varia entre 3 e 7 dias após a infecção e a transmissão ocorre

por até 15 dias após a infecção, principalmente por contato direto ou indireto (HOUE *et al.*, 1999). Durante esse período o vírus pode ser identificado no soro, sangue e secreções nasais e há desenvolvimento de resposta imune e detecção de anticorpos 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.*, 2014a).

## **2.6 Patogenia e Manifestações Clínicas**

As infecções causadas pelo BVDV podem ser agrupadas em quatro formas principais: infecções transitórias, observadas em animais suscetíveis que não estão imunes ao vírus; infecções persistentes, consequência da infecção fetal intrauterina; a DM, que acomete animais PI, após mutações do vírus NCP em CP; e a síndrome hemorrágica, uma forma grave da doença, onde o animal apresenta distúrbios de coagulação sanguínea culminando em morte.

### **2.6.1 Infecções Transitórias**

Bovinos de qualquer idade são suscetíveis a infecções transitórias, como resultado da transmissão horizontal de animais infectados ou através de fômites contaminados (BAKER *et al.*, 1987). O período de incubação dos pestivírus bovinos varia entre 3 e 7 dias pós-exposição, podendo variar dependendo do estado imune do hospedeiro, da cepa do vírus, da sua virulência e da dose do vírus transmitido (EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Uma vez infectados, os animais TI liberam baixos níveis de vírus nas secreções e excreções corporais por até 15 dias após a infecção (THURMOND *et al.*, 2005). Durante esse período o vírus pode ser identificado no soro, sangue e secreções nasais, havendo o desenvolvimento de imunidade vitalícia para animais TI contra a cepa do vírus infectante (EVERMANN; BARRINGTON, 2005).

As consequências e a severidade das manifestações clínicas em animais TI dependem de uma série de fatores que incluem o biótipo e a cepa viral infectante, a idade do animal, o *status* imunológico e/ou reprodutivo do animal e a ocorrência de infecções secundárias. A maioria das infecções de animais imunocompetentes é assintomática. Alguns isolados de

maior virulência podem provocar pirexia, sialorreia, anorexia, hiperemia, descarga nasal, tosse e diarreia (GROOMS *et al.*, 2004). Sinais de infecção respiratória também podem ser observados. Em casos mais severos, lesões ulcerativas na mucosa oral podem estar presentes.

Infecções transitórias resultam na redução dos índices de produtividade dos animais infectados, podendo causar dificuldade no ganho de peso e queda na produção leiteira. Touros TI podem ter fertilidade reduzida e servir como reservatórios do vírus (HOUE *et al.*, 2005; SCHWEIZER *et al.*, 2014;). Além disso, as infecções transitórias causam redução nos glóbulos brancos circulantes (BOLIN *et al.*, 1985). Essa redução de leucócitos está associada à imunodepressão, predispondo os animais TI a infecções secundárias, como mastites bacterianas, e possibilitam a combinação de agentes infecciosos (vírus e bactérias) que favorecem o desenvolvimento do complexo das doenças respiratórias bovinas (DRB), como consequência de um desequilíbrio nas defesas naturais do animal (KAPIL *et al.*, 2005).

Enfermidades respiratórias crônicas e quadros persistentes de dermatites também têm sido associados com a infecção pelo BVDV em animais jovens em sistema de confinamento (GRISSETT *et al.*, 2015). A BVD geralmente é autolimitante, cursando com alta morbidade e mortalidade muito baixa ou nula. No entanto, taxas de mortalidade superiores a 50% foram registradas em surtos com cepas de BVDV-2 que induzem a síndrome hemorrágica (PELLERIN *et al.*, 1994; GETHMANN *et al.*, 2015). Infecções com BVDV em conjunto com infecções secundárias, como visto no DRB, também podem elevar as taxas de mortalidade (KAPIL *et al.*, 2005).

### 2.6.2 Infecção de Fêmeas Gestantes

Apesar das infecções transitórias apresentarem efeitos negativos significativos nos índices de produção e no sistema imune dos animais infectados, a infecção de fêmeas gestantes resulta em efeitos mais graves. Os pestivírus possuem como principal característica a capacidade de atravessar a barreira transplacentária e infectar o embrião ou feto em desenvolvimento.

As consequências da infecção do concepto dependem do estágio de gestação em que ocorre a infecção, do biótipo (CP/NCP) e da cepa viral. Caso a fêmea gestante se infecte durante o período embrionário, que se estende até os 40 dias de gestação nos bovinos, é possível observar redução nas taxas de concepção com retorno ao cio em intervalos irregulares, como resultado da reabsorção e da morte embrionária precoce (RICHTER *et al.*,

2017). A infecção fetal entre os 40 e 120 dias de gestação com isolados NCP frequentemente resulta no nascimento de animais persistentemente infectados (PI) com o vírus. Nessa fase da gestação, o sistema imune fetal está em formação e ainda não é capaz de produzir anticorpos contra o vírus. O feto desenvolve imunotolerância à cepa infectante do BVDV e nascerá PI e sorologicamente negativo.

Se a infecção ocorrer entre os dias 120 e 175 de gestação, pode haver o nascimento de animais saudáveis ou ser observado a ocorrência de mumificação fetal, defeitos congênitos, abortos, natimortos e nascimento de filhotes fracos que morrem logo após o nascimento. A extensão das malformações observadas depende do período de organogênese, ou seja, de quais sistemas e órgãos estavam se desenvolvendo no momento da infecção fetal. A ocorrência de malformações fetais é um achado muito comum em rebanhos infectados com BVDV. As principais malformações podem ser encontradas no sistema nervoso central (hipoplasia cerebelar, microcefalia, hidrocefalia, mielinização deficiente na medula espinhal) e em lesões oculares (atrofia ou displasia da retina, catarata, microftalmia). Achados como aplasia tímica e malformações esqueléticas (braquignatismo, raquitismo e artrogripose) também podem ser observados. Em muitos rebanhos, as malformações são os primeiros e, algumas vezes, os únicos achados que indicam a presença do vírus (BROWNLIE *et al.*, 1990; GROOMS *et al.*, 2004; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Em geral, abortos em qualquer fase de gestação podem ser atribuídos ao BVDV. Fetos infectados no terço final da gestação, entre os dias 175 e 280, frequentemente nascem normais, livres do vírus e soropositivos. Os fetos tornam-se imunocompetentes após 175 dias de gestação e podem desenvolver uma resposta imunológica que, frequentemente, resulta na erradicação do vírus *in utero*. Após o nascimento, os animais podem ser infectados horizontalmente, por meio do contato com animais TI e com animais PI.

### 2.6.3 Infecção Persistente

A infecção persistente é resultante da habilidade dos pestivírus em atravessar a barreira transplacentária, estabelecer infecção fetal e induzir imunotolerância. O estabelecimento da infecção persistente ocorre quando o feto entra em contato com o vírus entre os dias 40 e 120 de gestação (Figura 4), sendo que apenas cepas NCP podem estabelecer infecções persistentes.



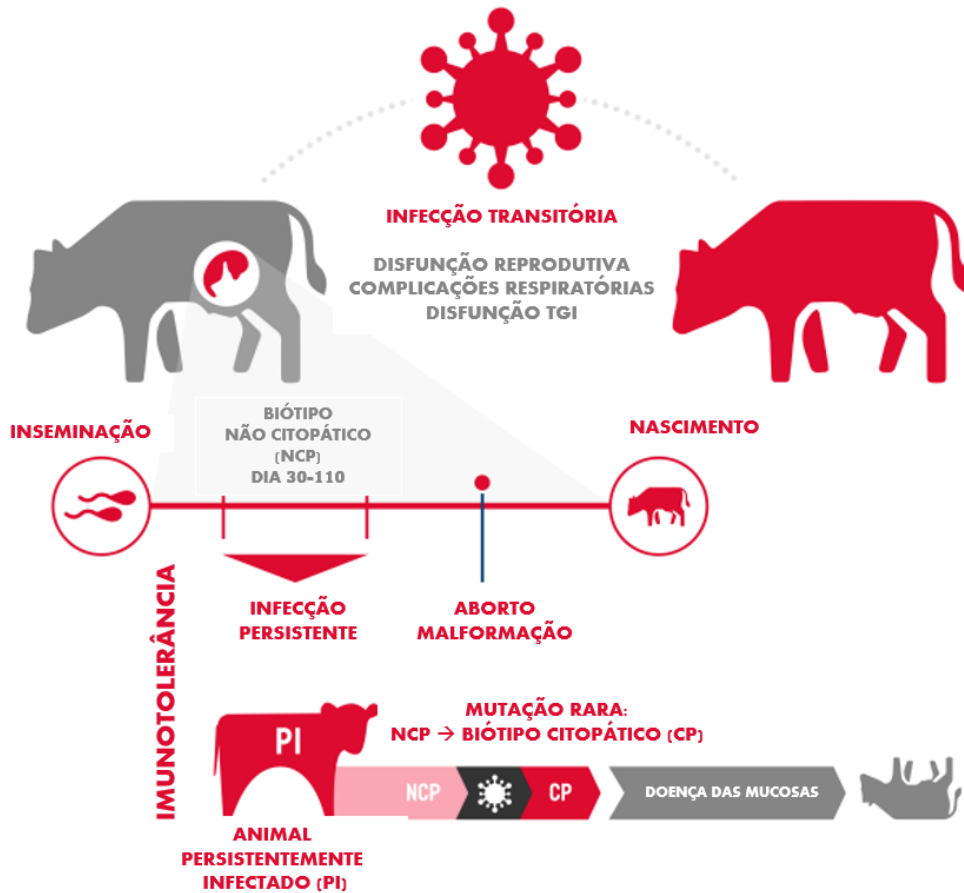
Os fetos infectados nesse período desenvolvem imunotolerância e seu organismo não consegue erradicar o vírus. Os animais PI nascem portadores e excretam o vírus continuamente em altos títulos em secreções (nasais, oculares, saliva, sêmen, leite) e em menores quantidades em excreções (urina, fezes) (BROCK *et al.*, 1998; ARENHART *et al.*, 2009). A infecção transplacentária, seguida do nascimento de animais PI, pode ocorrer nas infecções por qualquer pestivírus (BAKER *et al.*, 1995; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Animais PI com BVDV desempenham um papel importante na epidemiologia da infecção e são considerados reservatórios e fontes de disseminação do vírus na natureza (BAKER *et al.*, 1995; HOUE *et al.*, 1999). Os animais que nascem PI são geralmente soronegativos, dificultando a identificação desses animais através do uso de testes sorológicos. Os animais PI podem apresentar crescimento retardado, malformações congênitas ou serem aparentemente saudáveis, sem sinais de infecção. Alguns animais apresentam baixo desempenho zootécnico e são mais susceptíveis à infecções secundárias devido à função imunológica reduzida (KAPIL *et al.*, 2005). A maioria dos animais PI morre nos primeiros meses de vida, no entanto, alguns podem viver por até dois anos ou mais.

Existem diversos relatos de animais PI que sobrevivem até a idade adulta, podendo se tornar reprodutores e transmissores do vírus à progênie. Fêmeas PI que atingem a idade adulta geralmente produzem terneiros PI (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Se introduzidos em rebanhos suscetíveis, os animais PI podem causar perdas econômicas significativas.

A prevalência de animais PI pode variar entre 0,5% e 2% (GROOMS *et al.*, 2006; DUBOVI *et al.*, 2013). Através de medidas de prevenção e controle eficientes, é possível reduzir muito a prevalência de animais PI nos rebanhos. Após a adoção de medidas de biossegurança eficientes, a prevalência de animais PI pode chegar em 0,1% em rebanhos leiteiros, enquanto em rebanhos de corte essa prevalência pode ser ainda menor (BACHOFEN *et al.*, 2013b; SCHARNBÖCK *et al.*, 2018).

Figura 4. Consequências da infecção por pestivírus em fêmeas gestantes e como ocorre o desenvolvimento da doença das mucosas (DM)



Fonte: Adaptado de Peterhans *et al.*, 2010.

#### 2.6.4 Doença das Mucosas (DM)

Os animais PI podem desenvolver um quadro clínico fatal denominado DM, que se caracteriza por apresentar 100% de mortalidade nos rebanhos acometidos (RAMSEY; CHIVERS, 1953; BIANCHI *et al.*, 2017).

O mecanismo da DM está associado ao surgimento do biótipo CP da cepa de BVDV NCP com qual o animal originalmente foi infectado *in utero*. O biótipo CP surge no próprio animal portador da cepa NCP como resultado de mutações, rearranjos, deleções ou recombinação da cepa NCP, quase sempre resultando na expressão da proteína NS3 clivada da NS2 (BACHOFEN *et al.*, 2010). Nos animais que desenvolvem a DM, os dois biótipos (CP e NCP) estão presentes. Essa superinfecção com a cepa CP, homóloga à cepa NCP, com a qual os animais foram primeiramente infectados, origina a DM (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SIMMONDS *et al.*, 2011; NEILL *et al.*, 2013;) (Figura 4).

Com menos frequência, pode ocorrer uma superinfecção com uma cepa CP proveniente de uma fonte externa homóloga à cepa NCP proveniente de vacinas vivas modificadas ou de transmissão a partir de outros animais PI (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SCHWIZER; PETERHANS, 2014; LANYON *et al.*, 2014). A DM é rara e possui um início súbito, ocorrendo, principalmente, em animais com seis meses a dois anos de idade.

As características clínicas da DM são as mesmas que as de uma infecção transitória, no entanto, com maior gravidade. Os animais podem apresentar pirexia, anorexia, sialorreia, diarreia, desidratação, lesões erosivas na mucosa oral, nasal, esôfago, intestino delgado e nas placas de Peyer, necrose de tecidos linfoides, culminando em morte dentro de poucos dias (HOUE; LINDBERG; MOENNIG, 2006; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014; OIE, 2018). A forma crônica, menos comum, pode estender-se por várias semanas ou meses, com sinais clínicos recorrentes. Os animais apresentam sinais inespecíficos como úlceras na pele, áreas de alopecia, inapetência, lesões erosivas na mucosa oral, perda de peso e apatia progressiva. Essa condição pode se estender por vários meses e normalmente o animal acaba vindo a óbito (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; BIANCHI *et al.*, 2017).

Na DM é observada uma ampla distribuição do antígeno viral, incluindo nas glândulas salivares, ocorrendo severa depleção de todos os tecidos linfoides e lesões graves no trato gastrointestinal (BRODERSEN *et al.*, 2014). A DM não é transmissível, pois somente animais PI a desenvolvem, e estes possuem os dois biótipos CP e NCP envolvidos na patogênese (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). A DM representa um exemplo raro onde a evolução viral associada com a mudança de biótipo leva à morte do animal afetado e, por fim, à extinção do vírus CP causador da doença (PETERHANS *et al.*, 2010).

#### 2.6.5 Síndrome Hemorrágica

No final dos anos 1980, casos severos de BVD aguda tornaram-se frequentes. Até o momento, conhecia-se somente as consequências da infecção transplacentária, tais como as perdas reprodutivas, o nascimento de animais PI e a DM. Houve um aumento no relato de surtos de BVDV em animais adultos que apresentavam trombocitopenia, leucopenia, pirexia, diarreia sanguinolenta, epistaxe, hifema e hemorragia conjuntival e subconjuntival, hemorragia nas mucosas oral e genital, além de outros distúrbios de coagulação sanguínea. Essa forma de apresentação da infecção pelo BVDV foi posteriormente caracterizada e

denominada de BVD aguda hemorrágica ou síndrome hemorrágica (SH) e apresentava taxas de morbidade em torno de 50% e mortalidade em torno de 20% (KAHN *et al.*, 2007; OIE, 2018).

Ao longo dos anos, surtos importantes de SH já foram descritos em inúmeros países e a gravidade da infecção está diretamente relacionada à virulência da cepa envolvida. A disseminação de cepas de baixa virulência nos rebanhos ocorre como resultado do contato direto com animais PI, o que limita a disseminação desses vírus. Já a disseminação de vírus de alta virulência ocorre a partir de animais TI. Dois pontos importantes diferenciam a SH da DM: a presença de vírus citopático e as taxas de morbidade e mortalidade. Enquanto a patogenia da DM exige necessariamente a presença de vírus dos dois biótipos (CP e NCP), a SH apresenta apenas um biótipo do vírus, geralmente NCP. Além disso, as taxas de mortalidade na DM são de 100%, enquanto a taxa de morbidade é baixa, já que corresponde ao número de animais PI no rebanho. No entanto, na HS, as taxas de mortalidade são baixas, porém a taxa de morbidade é alta. Geralmente, entre 50 e 90% dos animais clinicamente infectados se recuperam (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; BIANCHI *et al.*, 2017).

## **2.7 Diagnóstico**

O diagnóstico de uma infecção causada por pestivírus pode apresentar alguns desafios, visto a alta diversidade genética e antigênica do gênero e o fato da BVD não apresentar nenhum sinal patognomônico. Portanto, para determinação da ocorrência de uma infecção torna-se necessário, inicialmente, a realização de uma anamnese completa do rebanho, atentando-se para os sinais clínicos e os achados pós-morte (SANDVIK *et al.*, 1999; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Perdas embrionárias, abortos, malformações fetais, nascimento de animais fracos ou morte perinatal são fortes indícios da ocorrência de pestivírus no rebanho. Casos de doença entérica e/ou respiratória com componentes hemorrágicos (melena, petéquias em mucosas, serosas etc.), erosões e ulcerações no trato digestivo também sugerem a circulação do vírus entre os animais (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Portanto, como a infecção é clinicamente diversa, um diagnóstico definitivo é obtido somente por testes laboratoriais através da utilização de técnicas de identificação de pestivírus de ruminantes, individualmente ou em rebanhos, possibilitando o diagnóstico por

detecção de anticorpos, antígenos ou genoma viral (SANDVIK *et al.*, 2004; NEWCOMER; GIVENS, 2013; OIE, 2018). Várias técnicas de diagnóstico podem ser utilizadas na detecção do BVDV. Estas dividem-se em testes diretos, que se baseiam na detecção do antígeno ou do RNA viral, e em testes indiretos, que detectam a resposta imune humoral do hospedeiro frente à ação do agente etiológico (FLORES; CARGNELUTTI, 2017).

A coleta de amostras biológicas irá depender das manifestações clínicas observadas e da condição do animal. O sangue, especialmente os leucócitos, de animais infectados de forma transitória ou persistente, apresentam altos títulos virais, sendo os títulos em animais PI muito maiores do que em animais TI, dada a alta carga viral nesses animais. O soro sanguíneo pode ser utilizado tanto para a detecção de anticorpos quanto do antígeno. Para detecção viral, sêmen e fragmento de diversos tecidos também podem ser utilizados, como orelha, glândula tireoide, cérebro, rim, baço, linfonodos e intestino (OIE, 2018).

Além de uma coleta correta da amostra biológica, a escolha e interpretação dos testes diagnósticos irão depender do tipo de infecção. Deve-se avaliar se a infecção é transitória ou persistente, pois, em uma infecção transitória, o vírus só é detectável por alguns dias, enquanto na infecção persistente, pode ser detectado durante toda a vida do animal. Após uma infecção transitória é possível a detecção de anticorpos e na infecção persistente os animais serão sempre soronegativos (OIE, 2018). Como os animais PI possuem uma alta carga viral, os testes de diagnóstico empregados nesta situação, apresentam uma excelente sensibilidade e especificidade (LANYON *et al.*, 2014).

Para identificação e confirmação de animais PI, é necessário que esses animais sejam soronegativos e apresentem dois testes com resultados positivos para detecção do antígeno viral, de amostras coletadas com, no mínimo, três semanas de diferença (OIE, 2018). O epitélio do trato respiratório superior, da orofaringe e os tecidos linfoides (linfonodos, baço, tonsilas e os agregados de linfócitos associados a mucosa do trato gastrointestinal, como as placas de Peyer) são um importante sítio primário de replicação após a infecção pela via oronasal, sendo os antígenos virais mais frequentemente detectados nesses tecidos.

A detecção rápida e sensível de pestivírus é um aspecto relevante no contexto de diagnóstico para programas de controle e erradicação, os quais têm sido focados na identificação de animais PI. Para isso, além dos testes convencionais para diagnóstico rápido (RT-PCR, ELISA), outros testes têm sido elaborados objetivando uma maior simplicidade e um melhor custo-benefício. Como exemplo, pode-se citar um tipo de amplificação isotermal

para detecção de RNA de BVDV, sem necessidade de enzimas e com uso de nanopartículas de ouro (GHASEMI MONJEZI *et al.*, 2016; ASKARAVI *et al.*, 2017). Os testes laboratoriais são baseados no isolamento viral em cultivo celular, detecção do antígeno viral (imunofluorescência, imunohistoquímica, ELISA), detecção do RNA viral (RT-PCR, RT-qPCR) e detecção de anticorpos por meio de sorologia (ELISA, soroneutralização) (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013;).

### 2.7.1 Isolamento Viral

Dentre os testes utilizados, o isolamento viral é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de BVDV. O isolamento viral é o único dentre os testes utilizados no diagnóstico de BVDV que diferencia vírus não viáveis de vírus biologicamente ativos (RIDPATH *et al.*, 2010; NEWCOMER; GIVENS, 2013; BRODERSEN *et al.*, 2014). O vírus pode ser isolado em diferentes tipos celulares, tais como células de corneto nasal bovino (BT), do testículo bovino (Btest) e na linhagem *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK) (OIE, 2018). O isolamento viral pode ser obtido por meio de amostras como secreção nasal, sangue, soro, sêmen, leite e tecidos de animais infectados, como fragmento de orelha ou tecidos de fetos abortados (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013; LANYON *et al.*, 2014; OIE, 2018).

Contudo, para a realização dessa técnica são necessárias amostras coletadas de maneira asséptica e conservadas sob refrigeração. Ademais, caracteriza-se por ser um teste de alto custo, laborioso e demorado, podendo levar até 15 dias para a emissão do resultado (BRUM; WEIBLEN; FLORES, 2017). Outra dificuldade observada é a contaminação do cultivo celular com pestivírus NCP, geralmente provenientes de soro fetal bovino (SFB). O SFB necessita estar livre de anticorpos neutralizantes contra pestivírus (SANDVIK *et al.*, 1999; OIE, 2018). Mais de 90% dos isolados de campo NCP não causam danos visíveis ao cultivo celular, como os observados nas células infectadas com cepas CP, sendo necessário o uso de imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX) para confirmar a presença do vírus (SANDVIK *et al.*, 1999; SALIKI; DUBOVI, 2004; HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; OIE, 2018;).

Diante disso, outras técnicas têm sido mais utilizadas no diagnóstico da infecção por BVDV (BRUM; WEIBLEN; FLORES, 2017). Atualmente, a técnica de RT-PCR passou a

ser amplamente aceita como o teste padrão para o diagnóstico da infecção por BVDV (OIE, 2018).

### 2.7.2 Imunohistoquímica

As técnicas de imunohistoquímica (IHC) fornecem um diagnóstico específico, sensível e robusto para detecção de pestivírus (SANDVIK *et al.*, 1999; LANYON *et al.*, 2014; OIE, 2018). A imunoperoxidase (IPX) a partir de fragmento de orelha ganhou aplicação importante na investigação da existência de animais PI em rebanhos bovinos, principalmente na América do Norte (GROOMS; KEILEN, 2002; RIDPATH *et al.*, 2012; BRODERSEN *et al.*, 2014). Fragmentos de orelha são facilmente coletados, transportados e apresentam uma boa estabilidade, permitindo estocagem em formol ou refrigerador antes de serem processadas, sem prejuízo no resultado (MILLER *et al.*, 2004).

Além disso, nos animais PI o antígeno viral está presente em grande concentração e não há interferência de anticorpos maternos, como geralmente ocorre em exames sorológicos, permitindo dessa forma, a utilização em animais jovens (GROOMS *et al.*, 2002; DUBOVI *et al.*, 2013). Dessa maneira, a IPX tem alcançado sensibilidade de 100%, inclusive na detecção de animais PI infectados com cepas HoBiPeV (BAUERMAN *et al.*, 2014).

A imunofluorescência (IF) também é utilizada como teste de detecção de antígenos virais. Pode ser realizada em cortes histopatológicos ou cultivos celulares. Permite a visualização da infecção pelo BVDV, conforme o mesmo princípio utilizado na IPX, variando somente o marcador ou conjugado associado ao anticorpo conjugado. A maior desvantagem associada a essa técnica é a dificuldade de interpretação dos resultados e o surgimento de reações inespecíficas (FLORES; CARGNELUTTI, 2017).

### 2.7.3 RT-PCR e RT-qPCR

As técnicas de biologia molecular oferecem alta sensibilidade e especificidade e são rápidas quanto à obtenção dos resultados, permitindo a identificação (VILCEK *et al.*, 1994), diferenciação (CANAL *et al.*, 1998, VILCEK *et al.*, 2001) e quantificação viral (HOFFMANN *et al.*, 2006).

Quando associadas ao sequenciamento genético, podem fornecer informações sobre espécie e subgenótipo viral, possibilitando identificar variantes virais e novos pestivírus (SCHIRRMIEIER *et al.*, 2004; KIRKLAND *et al.*, 2007; STHAL *et al.*, 2009). Atualmente,

a RT-PCR passou a ser amplamente aceita como referência para o diagnóstico de BVDV. É um método preferível ao isolamento viral devido à rapidez, baixo custo e alta sensibilidade e especificidade (KIM; DUBOVI, 2003). Amostras provenientes de tanques de leite, *pool* de soro ou órgãos, fragmentos de tecidos, secreção nasal, sêmen e embriões podem ser utilizadas nas técnicas de RT-PCR e RT-qPCR sem que o armazenamento por tempo prolongado interfira na análise (VILCEK *et al.*, 2001; NEWCOMER *et al.*, 2013; LANYON *et al.*, 2014; OIE, 2018).

Tais técnicas moleculares possibilitam a avaliação de possíveis contaminações por pestivírus em SFB e em vacinas. Existe ainda, a vantagem de realizar os testes em *pools* de amostras, permitindo a análise simultânea de um grande número de amostras, tornando-se uma abordagem rápida e econômica na detecção de pestivírus bovinos. Esses *pools*, quando positivos, podem ser testados em *pools* menores ou individualmente (WEINSTOCK *et al.*, 2001).

Objetivando facilitar o diagnóstico e diferenciar infecções transitórias de persistentes, testes de RT-qPCR têm sido desenvolvidos avaliando-se a carga viral presente na amostra de interesse (LANYON *et al.*, 2014). Além disso, testes de RT-qPCR também têm sido desenvolvidos com a capacidade de diferenciar BVDV-1 e 2 (BAXI *et al.*, 2006) ou para detectar apenas HoBiPeV (LIU *et al.*, 2008).

A técnica de transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando-se primers específicos para as regiões alvo 5'NCR, N<sup>pro</sup> e E2 permite uma melhor caracterização das amostras, quando comparada à outras técnicas (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994; SILVEIRA *et al.*, 2017). A região 5'NCR é bastante conservada nos pestivírus, permitindo a classificação em espécies, enquanto a análise das regiões N<sup>pro</sup> e E2 permite inferir os subgenótipos dos pestivírus (SANDVIK *et al.*, 1999; VILCEK *et al.*, 2001; OIE, 2018).

Recentemente, *kits* comerciais de RT-qPCR têm sido validados para detectar RNA de BVDV em amostras de fragmentos de orelha, sangue, plasma, soro e leite. Alguns desses *kits* já apresentaram uma ótima sensibilidade (100%) para detecção de HoBiPeV em fragmentos de orelha (BAUERMANN *et al.*, 2014). Entretanto, ainda podem ocorrer falhas no uso das técnicas de RT-PCR e RT-qPCR, pois vários testes desenvolvidos para detectar BVDV falham na detecção e diferenciação de HoBiPeV ou possuem sensibilidade diminuída quando comparada à detecção de BVDV. Isso ocorre devido a variações na sequência do



primer e/ou da sonda utilizados nessas metodologias (SCHIRRMIEIER *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2008; BAUERMANN *et al.*, 2014). Dessa forma, há uma necessidade de vigilância contínua e do desenvolvimento de novos testes visando a detecção de cepas divergentes, como, por exemplo, para identificação dos HoBiPeV ou de novos pestivírus (DUBOVI *et al.*, 2013).

#### 2.7.4 ELISA de Captura de Antígeno

Os testes de ELISA de Captura de Antígeno (ECA) são testes comerciais que possibilitam identificar a presença do antígeno através da detecção específica com anticorpo marcado. Este método é uma alternativa eficiente que está sendo cada vez mais utilizada por laboratórios de diagnóstico veterinário na detecção de animais PI. É possível utilizar amostras de plasma, sangue total, fragmentos de orelha e soro bovino (CORNISH *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que esse tipo de ensaio não é ideal na detecção de animais TI. A presença de anticorpos maternos pode reduzir sua sensibilidade, não sendo o teste mais indicado para animais menores de três meses de idade. Duas proteínas altamente conservadas do BVDV podem ser o antígeno alvo nesse teste: a NS3 (p80) e a E<sup>ms</sup> (DUBOVI *et al.*, 2013). Como vantagens, esses testes apresentam boa especificidade, sensibilidade, rapidez, ótimo custo-benefício e praticidade (CORNISH *et al.*, 2005; FLORES; CARGNELUTTI, 2017).

#### 2.7.4 Testes Sorológicos

Os testes sorológicos são excelentes para levantamentos epidemiológicos e monitoramento de rebanhos. Os métodos mais comumente utilizados para a detecção de anticorpos específicos para BVDV são o teste de soroneutralização (SN) e o ELISA (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; OIE, 2018).

##### 2.7.4.1 Soroneutralização

A SN é o teste sorológico de referência para detecção e titulação de anticorpos contra BVDV e pode ser muito específico e facilmente adaptável ao tipo de pestivírus presente em cada região (FLORES; CARGNELUTTI, 2017). Devido à sua alta especificidade e às diferenças antigênicas entre os pestivírus, é essencial usar um vírus-teste similar aos isolados de campo (SANDVIK *et al.*, 1999; HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; OIE, 2018).

Apesar de ser muito específica, a SN é uma técnica demorada, laboriosa, de alto custo e envolve, obrigatoriamente, o uso de cultivo celular e de manipulação viral (BRUM; WEIBLEN; FLORES, 2017). Em caso de cepas NCP, maioria dos isolados de campo, é necessário o uso de IHC para a leitura dos resultados. Além do mais, os resultados podem variar entre laboratórios devido ao uso de diferentes cepas virais ou tipos celulares (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; DUBOVI *et al.*, 2013; LANYON *et al.*, 2014). Cabe ressaltar que os testes sorológicos podem apresentar valor limitado em rebanhos vacinados, podendo causar dificuldades na interpretação dos resultados, devido às diferenças antigênicas baseadas na soroneutralização cruzada (PIZARRO-LUCERO *et al.*, 2006; BACHOFEN, *et al.*, 2008) e na resposta dos animais PI à vacinação (FULTON *et al.*, 2003). Países que obtiveram êxito em seus programas de erradicação, como os países nórdicos, não fizeram o uso de vacinas (LANYON *et al.*, 2014).

Exames sorológicos de rebanhos vacinados servem unicamente para verificar o *status* sorológico e a possível circulação do vírus no rebanho. A identificação de soropositividade de um animal indica apenas uma exposição prévia ao agente. Por sua vez, animais PI não produzem anticorpos específicos ao BVDV com o qual foram infectados durante a gestação (BACHOFEN *et al.*, 2013), porém podem responder imunologicamente a cepas heterólogas de BVDV (BEDENICE *et al.*, 2011). Os pestivírus apresentam reações sorológicas cruzadas e em populações onde há a circulação de mais de uma espécie viral, os resultados sorológicos devem ser interpretados com cuidado. Até o momento, não existem testes comerciais que possibilitem a diferenciação entre BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV.

#### 2.7.4.2 ELISA

Existem diversos testes de ELISA desenvolvidos *in house* ou na forma de *kits* comerciais para detecção de anticorpos em amostras de soro, leite individual ou tanque de leite. No entanto, esses testes não são capazes de distinguir anticorpos contra as espécies de pestivírus. Como vantagens, pode-se citar a facilidade de triagem de muitas amostras, rapidez e um menor custo em relação à técnica de SN. Geralmente possuem uma alta especificidade, embora a sensibilidade possa ser variável de acordo com o *kit* comercial utilizado (SANDVIK *et al.*, 1999; HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; DUBOVI *et al.*, 2013; LANYON *et al.*, 2014; OIE, 2018).

## 2.8 Prevenção e Controle

Os pestivírus estão disseminados na população de ruminantes do Brasil e, apesar do País possuir o maior rebanho bovino do mundo, não apresenta programas de controle e erradicação desses vírus (SILVEIRA *et al.*, 2017; EVANS *et al.*, 2019). Há uma significativa perda econômica causada pelo BVDV em bovinos, devido à sua ampla distribuição mundial, apresentação clínica variada, imunodepressão, predispondo o animal a outras doenças, e principalmente devido às perdas reprodutivas.

Estima-se que na Europa o custo de um animal infectado varia em média de U\$175-759 por ano, sendo maior em rebanhos leiteiros do que em rebanhos de corte. Este intervalo considera a doença subclínica, geralmente observada em rebanhos com infecção endêmica por BVDV. Em surtos onde há cepas de maior virulência em que os sinais clínicos são severos, esses prejuízos podem ser ainda maiores (YARNALL *et al.*, 2017). Nos EUA, 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, muitos países já possuem programas oficiais de controle e erradicação do vírus (RICHTER *et al.*, 2017; THOMANN *et al.*, 2017; CHAROENLARP *et al.*, 2018; SCHWEIZER *et al.*, 2021). O controle da infecção pelo BVDV baseia-se, principalmente, na identificação e eliminação dos animais PI, de forma a impedir que o vírus continue circulando e evitando a possibilidade de nascimentos de novos animais PI (BOLIN *et al.*, 1995; GROOMS *et al.*, 2004).

A adoção de medidas de biossegurança baseadas no histórico epidemiológico do rebanho, dos sinais clínicos, de achados pós-morte, do tipo de infecção (transitória ou persistente) e do uso correto de vacinas (RADOSTITS *et al.*, 2007) são ferramentas eficientes que também devem ser utilizadas para eliminação do BVDV nos rebanhos.

Para a identificação dos animais PI a estratégia mais utilizada é a testagem de todos os animais da propriedade, utilizando o teste de ELISA para detecção de antígeno a partir de um fragmento de orelha do animal. Após a identificação e remoção dos animais PI, em países onde não há o uso de vacinas, o segundo estágio do programa consiste no monitoramento dos rebanhos quanto à presença de anticorpos, o que é verificado através da aplicação de um teste de ELISA a partir de amostras de soro ou leite (QUINET *et al.*, 2016; THULKE *et al.*, 2018). Além desse monitoramento contínuo dos rebanhos livres para rápida detecção de uma possível reinfecção, os programas têm focado em medidas de biossegurança para prevenir a

introdução viral. Estas medidas agem especialmente sobre o comércio animal para prevenir a comercialização de animais PI, fêmeas gestantes de fetos PI e mesmo de animais transitoriamente infectados (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014; LANYON *et al.*, 2014; ALPAY; TOKER; YEŞILBAĞ, 2018).

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). Após a eliminação de animais PI, o uso da vacina é decidido conforme a situação epidemiológica, o que irá variar dependendo da prevalência de BVDV, da densidade animal, do contato com populações silvestres, da variação das cepas circulantes e do tipo de produção. Em propriedades com alta densidade animal, comércio intensivo e alta prevalência de BVDV, a vacinação precisa ser empregada. Em propriedades com baixa prevalência, a vacinação não é obrigatória, já que o risco de reintrodução pode ser muito pequeno (NEWCOMER *et al.*, 2013).

Portanto, um programa de controle pode ter duas fases. Primeiramente, a eliminação dos animais PI, seguida por vacinação e erradicação do agente viral (WERNIKE *et al.*, 2017). A prevalência de animais PI varia de 1% a 2%, de forma que muitos indivíduos da população devem ser testados. No entanto, através das medidas de prevenção e controle, essa prevalência tem diminuído consideravelmente em algumas regiões do mundo. Em bovinos de leite essa prevalência é em torno de 0,1%, enquanto em bovinos de corte é ainda menor (DUBOVI *et al.*, 2013; BRODERSEN *et al.*, 2014).

Países que se destacam como produtores de bovinos na Europa e América do Norte já utilizam programas oficiais ou não oficiais de prevenção e controle do BVDV (VAN CAMPEN *et al.*, 2010; SCHWEIZER *et al.*, 2021). A estruturação destes programas baseia-se na identificação e eliminação de animais PI, na prevenção da introdução do vírus no rebanho, na adoção de programas de imunização e de controle da biocontaminação para, inicialmente, manter a disseminação do vírus sob controle e futuramente, obter a erradicação total do vírus nos rebanhos (HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; VAN CAMPEN *et al.*, 2010).

No início da década de 1990, os países escandinavos implementaram programas de erradicação do BVDV, baseados no não uso de vacinação, no monitoramento sorológico e na remoção de animais PI (LINDBERG *et al.*, 2006; VAN CAMPEN *et al.*, 2010). O sucesso alcançado por esses programas tem levado ao desenvolvimento de programas nacionais e

regionais de controle e erradicação em vários outros países, que conseguiram eliminar ou diminuir consideravelmente a presença do vírus (SCHIRRMIEIER *et al.*, 2014; REARDON *et al.*, 2018). Alguns países europeus como a Suécia, Finlândia, Noruega e Dinamarca conseguiram erradicar a doença ou encontram-se em fase final de erradicação. Partes da Alemanha, Holanda, França, Itália, Eslovênia, Escócia, Bélgica, Irlanda, Grécia e Áustria também estão com programas de erradicação em curso (HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006; LANYON *et al.*, 2014; QUINET *et al.*, 2016; REICHEL; LANYON; HILL, 2018).

O modelo escandinavo também tem influenciado as políticas de controle do BVDV em países como os Estados Unidos, Rússia, Austrália e Nova Zelândia que já iniciaram seus programas de erradicação. No entanto, a erradicação do vírus pode ser bastante difícil devido às características dos locais, dos tipos de criação, das espécies de hospedeiros e das cepas envolvidas em cada região (MOENNIG; HOUE; LINDBERG, 2005; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Os programas de controle e erradicação do BVDV podem ser utilizados por todos os países, porém com devidas adequações relativas ao tipo de rebanho existente, características do local, histórico epidemiológico e às possibilidades de vacinas e métodos de diagnósticos disponíveis (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; HEFFERNAN *et al.*, 2009). Animais silvestres, como javalis e cervídeos, apresentam potencial de atuarem como reservatórios do vírus, já que os pestivírus não são espécie-específicos, podendo ser um obstáculo no sucesso da implantação de estratégias de controle do BVDV em bovinos (BRODERSEN *et al.*, 2014).

Para o sucesso no controle e erradicação de pestivírus, além das medidas de biossegurança já citadas, faz-se necessário a realização de pesquisas contínuas, a fim de reavaliar os programas, visto que há risco de emergência de novos pestivírus, de vírus que mudaram de hospedeiros ou que aumentaram a sua virulência. Como exemplo de emergência de novos pestivírus, tem-se o vírus HoBiPeV, que tem sido detectado na última década em vários países. Esse vírus tem se tornado um potencial risco para os programas de controle e erradicação já existentes, uma vez que tanto os animais soronegativos quanto os soropositivos para BVDV poderão ser suscetíveis à infecção por HoBiPeV, podendo até tornar-se restritivo o comércio internacional de animais e produtos com países que são livres deste pestivírus (BAUERMANN *et al.*, 2013; BAUERMANN; FALKENBERG; RIDPATH, 2013).

A presença contínua do BVDV nos rebanhos está relacionada a falhas na implementação de programas de imunização, ao não estabelecimento de programas de monitoramento de rebanho e ao não desenvolvimento de programas eficazes de biossegurança (RADOSTITS *et al.*, 2007). Os recentes avanços nas técnicas laboratoriais contribuíram positivamente para as campanhas de controle e erradicação de BVDV em outros países. A combinação de diferentes técnicas de ELISA, imunohistoquímica e biologia molecular melhoraram o diagnóstico individual e de rebanho (HOUE *et al.*, 2006). A utilização de diferentes testes diagnósticos é essencial para o desenvolvimento de eficientes programas de controle e erradicação do BVDV. Esses testes devem ser capazes de informar o estado sanitário do rebanho, identificar animais PI e ser adequado na diferenciação das principais variantes virais circulantes (HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005).

Atualmente, não estão disponíveis comercialmente diagnósticos específicos para HoBiPeV. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que testes diagnósticos para BVDV podem identificar HoBiPeV, ainda que com sensibilidade reduzida. Testes comerciais de ELISA com base na proteína NS3 para detecção de anticorpos contra o BVDV apresentam falhas consideráveis na detecção de amostras com moderados títulos de anticorpos para HoBiPeV. Resultados melhores foram verificados em testes de ELISA baseados na proteína E<sup>ms</sup>. A falta de anticorpos monoclonais específicos para HoBiPeV dificulta a concepção de testes diferenciais. Alguns *kits* comerciais de RT-PCR para BVDV podem identificar HoBiPeV, ainda que a diferenciação entre as espécies de pestivírus não seja possível sem o sequenciamento das amostras. O soro de animais vacinados e com altos títulos de anticorpos contra cepas de BVDV-1 e/ou BVDV-2 testados frente ao HoBiPeV demonstrou títulos moderados ou baixos na maioria das amostras.

A erradicação oferece a grande vantagem de melhorar a saúde do rebanho, porém cria uma população de hospedeiros suscetível que necessita ser protegida por medidas de biossegurança (MOENNIG *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2018; EVANS *et al.*, 2019; BAUERMAN; RIDPATH, 2021). Rebanhos com baixos títulos 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 a identificação e eliminação de animais PI o foco principal de programas de prevenção e controle (LANYON *et al.*, 2014).

Para evitar a reintrodução da infecção, deve-se recorrer às medidas básicas de biossegurança e à testagem de todos os animais antes de ingressarem na propriedade. Com isso, é possível manter os rebanhos livres da infecção, uma vez que a principal forma de introdução da infecção na propriedade é por meio de animais infectados (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Considerando que tanto a epidemiologia quanto a patogênese do BVDV ainda não foram completamente elucidadas, seu controle torna-se complexo e, normalmente, vários desafios surgem durante o processo de erradicação da doença em um rebanho. Sugere-se que em áreas de alta densidade de animais com alta prevalência do BVDV o manejo seja feito com base em quatro princípios: biossegurança, descarte de animais PI, monitoramento permanente e vacinação. Para o sucesso de um programa de erradicação esses princípios devem ser implementados simultaneamente, de forma rígida e constante (BAKER *et al.*, 1987; LAUREYNS *et al.*, 2017).

O controle da infecção por BVDV pode ser efetuado com ou sem o uso de vacinas, dependendo do histórico do rebanho, do risco de introdução do agente e de outros fatores epidemiológicos. A manutenção de um rebanho livre de BVDV sem vacinação é complexo devido à ampla distribuição do vírus e as múltiplas possibilidades de rotas de entrada no rebanho (BAKER *et al.*, 1987; DEREGT; LOEWEN, 1995). Para evitar a introdução da infecção, deve-se recorrer às medidas básicas de biossegurança, como testar todos os animais antes de ingressarem na propriedade. Com essa medida, é possível manter rebanhos livres da infecção, pois a principal forma de introdução do vírus é por meio de TI ou PI.

O vírus também pode entrar no rebanho através de outros animais domésticos (ovinos, caprinos, bubalinos e suínos) ou silvestres (javalis, cervídeos), via sêmen contaminado, transferência de embriões e fômites (BAKER *et al.*, 1987). Terneiros (potencialmente PI) e fêmeas gestantes soropositivas (potencialmente carregando fetos PI) devem ser especialmente considerados, pois representam potenciais formas de introdução do vírus nos rebanhos (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

O controle sem vacinação é indicado para casos específicos de rebanhos fechados, sem o ingresso frequente de animais e, conseqüentemente, de baixo risco. Rebanhos extensivos de gado de corte geralmente se enquadram nessa categoria. Esse tipo de controle é também indicado para rebanhos cujos parâmetros reprodutivos e clínicos não registrem eventos

sugestivos da infecção. Rebanhos com sorologia negativa e cujo ingresso de animais seja raro ou eventual também não apresentam grande risco de introdução do agente.

O controle com vacinação é indicado para rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica e reprodutiva e com confirmação da presença do BVDV (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). É recomendado o uso de vacinas principalmente para a imunização de fêmeas suscetíveis, de 2 a 3 semanas antes da temporada de reprodução, prevenindo a transmissão transplacentária e consequente geração de animais PI (MOENNIG *et al.*, 2005). A vacinação deve seguir o esquema indicado pelos fabricantes. Em terneiros, a vacinação é indicada para prevenção de doenças respiratórias e digestivas severas e deve ser feita aos 4 a 6 meses de idade, sendo aplicada uma segunda dose de 30 a 40 dias após a administração da primeira dose. Alguns animais ainda podem possuir anticorpos maternos nessa idade, sendo recomendada realização de um reforço aos 8 ou 12 meses de idade. Para manutenção dos títulos de anticorpos neutralizantes, os animais devem ser revacinados a cada 6 a 12 meses. O controle com vacinação também é indicado para propriedades de terminação de novilhos, nas quais animais de várias procedências são agrupados e mantidos em alta densidade por área. Rebanhos leiteiros, com introdução frequente de animais e troca de reprodutores, também podem ser aconselhados a realizar a vacinação. Rebanhos que comercializam reprodutores, mesmo que sejam negativos, podem vacinar os animais destinados à venda, o que protege de eventual infecção nos rebanhos de destino (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

A escolha da vacina e o protocolo vacinal ajudam a maximizar a eficiência de imunização dos animais. Há muitas vacinas comercialmente disponíveis e, geralmente, elas estão em combinação com outras vacinas virais e/ou bacterianas. Elas podem conter vírus vivos atenuados (MLV) ou inativados (KV), ser mono ou polivalentes e formuladas com adjuvantes oleosos ou hidróxido de alumínio, de forma que a resposta imune é tanto humoral quanto celular (FAIRBANKS; SCHNACKEL; CHASE, 2003). As MLV geralmente induzem uma resposta imune mais rápida, mais ampla e duradoura que as KV, além de fornecerem uma proteção fetal mais robusta. Isso porque elas induzem títulos maiores de anticorpos neutralizantes e uma resposta imune celular mais potente (DOWNEY-SLINKER *et al.*, 2016; PLATT *et al.*, 2017; WALZ *et al.*, 2018). Contudo, muitas vezes a KV é administrada por ela ser mais segura do que as MLV, por não serem imunodepressoras e



nem patogênicas. Antigamente, não era recomendada a administração de MLV em fêmeas gestantes, devido ao risco de infecção transplacentária, além de haver o risco de indução da DM em animais PI. Porém, atualmente, há vacinas MLV aprovadas para a vacinação de fêmeas gestantes, sob algumas condições específicas (KALAYCIOGLU; RUSSELL; HOWARD, 2012; NEWCOMER; CHAMORRO; WALZ, 2017).

Atualmente, o principal foco no desenvolvimento de vacinas é ampliar a proteção heteróloga e melhorar a eficácia na proteção fetal, basicamente para prevenir o nascimento de animais PI. Portanto, vacinas mais modernas, empregando novas tecnologias e novos adjuvantes estão sendo desenvolvidas e testadas experimentalmente. Como exemplo, têm-se as vacinas de DNA, de nanopartículas ou recombinantes de subunidade, que geralmente possuem como antígeno a glicoproteína E2 dos pestivírus, que é carregada e/ou expressa em vetores como alfavírus, baculovírus ou adenovírus (LOY *et al.*, 2013; PECORA *et al.*, 2015; LOKHANDWALA *et al.*, 2017; CAI *et al.*, 2018; CHUNG *et al.*, 2018; CIBULSKI *et al.*, 2018). Antigamente, o subgenótipo predominante nas vacinas tradicionais para BVD era o BVDV-1a (RIDPATH; BOLIN, 1994). Essas eram vacinas polivalentes (BVDV, BHV-1, PI-3 e BRSV), inativadas e produzidas com isolados Norte-Americanos e Europeus. As vacinas mais recentes tendem a incluir BVDV-1b e BVDV-2a na composição. Até o momento, não há nenhuma vacina contendo HoBiPeV (BAUERMAN *et al.*, 2013b).

Cabe ressaltar que há necessidade de uma constante atualização acerca das diferentes espécies e subgenótipos de pestivírus em circulação (NEWCOMER *et al.*, 2017). As falhas vacinais mais importantes estão relacionadas à variabilidade genética (DENG *et al.*, 2015) e antigênica (FLORES *et al.*, 2005) do BVDV. O mais indicado é que as vacinas contenham amostras ou antígenos virais semelhantes àqueles presentes na região na qual será usada (FULTON *et al.*, 2003; 2009; MAHONY *et al.*, 2005; HOUE *et al.*, 2006).

A reatividade sorológica cruzada entre os pestivírus é geralmente baixa, com neutralização cruzada apenas parcial, e isso apresenta implicações importantes para o diagnóstico e para a eficácia vacinal. Há evidências de proteção cruzada imunológica entre algumas cepas de BVDV, incluindo de diferentes genótipos (SCHNACKEL; CHASE, 2003). No entanto, foi demonstrado que a proteção cruzada imunológica é 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, as diferenças genéticas e antigênicas dos pestivírus possuem implicações no diagnóstico e

controle por vacinação (FLORES *et al.*, 2002), de modo que vacinas que contenham subgenótipos distintos aos circulantes em infecções naturais provavelmente não forneçam proteção adequada aos animais (FAIRBANKS; SCHNACKEL; CHASE, 2003; FULTON *et al.*, 2005a).

Ademais, há relatos de que vacinas contendo BVDV-1 e BVDV-2 induziram um baixo título de anticorpos neutralizantes contra o HoBiPeV, o que pode não conferir a proteção necessária contra a infecção por esse pestivírus (BAUERMANN *et al.*, 2013a; DECARO *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2017). Este questionamento também foi abordado após um estudo *in vivo* que verificou que a imunidade desenvolvida por uma vaca após a gestação de progênie persistentemente infectada (PI) por BVDV não foi suficiente para prevenir uma subsequente infecção fetal causada por HoBiPeV (BAUERMANN; FALKENBERG; RIDPATH, 2013).

Nos EUA e UE, existem dezenas de vacinas contra o BVDV, mono e polivalentes, atenuadas e inativadas. Aproximadamente 80% da população bovina da América do Norte é vacinada, e estima-se que essa taxa de vacinação seja quatro vezes maior do que na Europa, que apresenta cerca de 20% da população bovina vacinada. Entretanto, vários países na Europa, por exemplo, Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Noruega, não permitem a vacinação para BVDV (MOENNIG *et al.*, 2001; SCHARNBOCK *et al.*, 2018).

No Brasil, a vacinação ainda é incipiente e realizada de forma desigual entre as diferentes regiões e sistemas de produção (FLORES *et al.*, 2005). A maioria das vacinas licenciadas para o BVDV no País são inativadas e contém apenas BVDV-1a ou BVDV-1a e BVDV-2b. Recentemente, uma vacina viva atenuada contendo as cepas KE-9 (BVDV-1b) e NY-93 (BVDV-2a) recebeu autorização de comercialização no País (CTNBio, 2016). Até o momento não existem vacinas comerciais disponíveis para o vírus HoBiPeV e nem para os subgenótipos recentemente identificados de BVDV-1 e BVDV-2 (WEBER *et al.*, 2014b; SILVEIRA *et al.*, 2017; 2018; DIAS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2021).

Diversos trabalhos realizados com as vacinas disponíveis no Brasil têm demonstrado baixa eficiência frente aos isolados brasileiros, além de uma produção de baixos títulos de anticorpos e de ausência de proteção fetal (VOGEL *et al.*, 2002; ANZILIERO *et al.*, 2015). Isso deve-se, principalmente, à grande diversidade genética e antigênica observada nas cepas de BVDV. Para alcançar uma melhor imunidade de rebanho, as vacinas utilizadas no Brasil necessitam ser revisadas, devendo conter as cepas prevalentes ou tipos antigênicos presentes no País (BIANCHI *et al.*, 2011; WEBER *et al.*, 2014a, 2014b; SILVEIRA *et al.*, 2017;

2018), pois a proteção contra cepas homólogas à da vacina geralmente é superior quando comparada a cepas heterólogas. Portanto, as pesquisas que visam conhecer quais pestivírus circulam em um país são extremamente relevantes (MAHONY *et al.*, 2005; RIDPATH *et al.*, 2010; NEWCOMER; GIVENS, 2013; BRODERSEN *et al.*, 2014).

Com base nisso, não há nenhuma vacina considerada 100% eficaz. Substituir as vacinas inativadas por vacinas mais eficazes, como as MLV ou vacinas de subunidade, expressas em diferentes sistemas, pode ser uma boa opção (PECORA *et al.*, 2015). Apesar da grande quantidade de vacinas, a maioria dos programas de controle e erradicação não adota a vacinação, sendo que, em todos os países onde foi atingido o *status* de zona livre do agente, como nos países escandinavos, vacinas não foram utilizadas. Nesses países, o principal objetivo foi a identificação e a remoção dos animais PI. A vacinação não foi utilizada como parte do programa de erradicação devido ao fato de que, com a vacinação, perde-se o indicador sorológico da presença da infecção no rebanho. A incidência do BVDV era relativamente baixa, o que encorajou que fosse implementado o programa de erradicação sem a utilização de vacina. Além disso, a importação de animais, o transporte e a densidade eram relativamente baixos quando comparados com outros países como o Brasil, por exemplo.

Em países em que a prevalência do BVDV é próxima ou acima de 50%, associada com uma grande movimentação e importação de animais, programas de controle e erradicação devem utilizar a vacinação do rebanho, além da identificação e eliminação dos animais PI (BAUERMANN; FLORES, 2017). Considerando que tanto a epidemiologia quanto a patogênese do BVDV ainda não foram completamente elucidadas, seu controle torna-se complexo e, normalmente, vários desafios surgem durante o processo de erradicação da doença em um rebanho. Sugere-se que em áreas de alta densidade de animais com alta prevalência do BVDV o manejo seja feito com base em quatro princípios: biossegurança, descarte de animais PI, monitoramento permanente e vacinação. Para o sucesso de um programa de erradicação esses princípios devem ser implementados simultaneamente, de forma rígida e constante (BAKER *et al.*, 1987; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; LAUREYNS *et al.*, 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Em decorrência da escassez de dados sobre pestivírus de ruminantes nas regiões Norte e Nordeste do Brasil associado ao crescente aumento dos rebanhos bovinos nessas regiões, o objetivo geral dessa dissertação é a geração de dados epidemiológicos que servirão de subsídio para elaboração de programas oficiais de prevenção e controle, e futuramente, erradicação de pestivírus de ruminantes no Brasil.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Determinar as espécies e subgenótipos de pestivírus de ruminantes presentes na região Norte do País, através do sequenciamento parcial de seus genomas, seguido de análise filogenética.

Determinar a soroprevalência das espécies de pestivírus nos rebanhos da região Norte e Nordeste do Brasil através de análises sorológicas utilizando a técnica de soroneutralização (SN).

Embasar futuros programas oficiais de prevenção e controle.

#### **4. MANUSCRITO CIENTÍFICO**

Os materiais e métodos empregados na realização deste estudo e os resultados gerados serão apresentados na forma de manuscrito científico. Além dos dados sobre a Região Norte, foco desta dissertação, o artigo conterá também os dados referentes à Região Nordeste, que foram objeto de estudo da dissertação de Daniela Eliete Puhl (2019). O manuscrito está em processo de escrita e posteriormente será realizada correção da ortografia e gramática inglesa. A submissão do artigo será feita para a revista científica *Transboundary and Emerging Diseases*, que apresenta fator de impacto 5.005 e Qualis Capes A2.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

A atividade agropecuária brasileira desempenha um importante papel na economia global e a bovinocultura tem sido um ponto estratégico para o desenvolvimento deste setor. De acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, em 2020 o agronegócio brasileiro foi responsável por 26,6% do PIB nacional (CEPEA; CNA, 2020). No mesmo ano, o rebanho bovino brasileiro foi o maior do mundo, representando 14,3% do rebanho mundial (USDA-FAS, 2020). Apesar da importância da bovinocultura no país, as doenças infectocontagiosas, principalmente as doenças virais, comprometem tanto a saúde quanto a produtividade dos animais, sendo uma preocupação constante nos programas de sanidade animal (HOUE *et al.*, 2003). Com cada vez mais países recebendo certificação de zona livre de Febre Aftosa (OIE, 2021), os pestivírus de ruminantes têm se tornado os vírus de maior importância para a bovinocultura mundial e causam grandes perdas econômicas em rebanhos leiteiros e de corte em todo mundo (LANYON *et al.*, 2014; RICHTER *et al.*, 2017).

Embora os pestivírus estejam amplamente difundidos no território nacional, não existe um programa oficial de controle e erradicação de pestivírus de ruminantes no Brasil. Vários relatos mostram a presença da infecção pelo BVDV no Brasil desde a década de 1960 (CORREA *et al.*, 1968). Desde então, diversos estudos foram realizados demonstrando a ampla distribuição de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV nos rebanhos bovinos brasileiros, com taxas de soropositividade variando entre 18 e 90% (CANAL *et al.*, 1998; POLETTO *et al.*, 2004; FLORES *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2006; QUINCOZES *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2017; 2018; MOSENA *et al.*, 2017a; 2017b).

Considerando que tanto a epidemiologia quanto a patogênese do BVDV ainda não foram completamente elucidadas, seu controle torna-se complexo, podendo surgir durante o processo de erradicação da doença em um rebanho. Em áreas com alta densidade animal e com alta prevalência de pestivírus de ruminantes, o monitoramento permanente dos rebanhos deve ser implementado de forma constante, associado às medidas de biossegurança, identificação e eliminação de animais PI e utilização de vacinas eficazes. (BAKER *et al.*, 1987; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; LAUREYNS *et al.*, 2017). Portanto, pesquisas que visam identificar e caracterizar os pestivírus em determinadas regiões são essenciais para implementação de programas de prevenção e controle bem-sucedidos.

As informações contidas nessa dissertação melhoram a compreensão da diversidade genética e antigênica dos pestivírus de ruminantes em regiões onde os dados epidemiológicos acerca desse agente viral são escassos, ou até mesmo, inexistentes. O conhecimento sobre os pestivírus circulantes é significativo para o estabelecimento de ferramentas diagnósticas e programas de controle eficientes. A combinação de pestivírus registrada no Brasil é única e representa uma das maiores diversidades genéticas já descritas no mundo.

É importante enfatizar que o Brasil possui diferentes biomas e regiões geográficas distintas, bem como diferentes sistemas de criação de animais. O conhecimento da diversidade genética regional dos pestivírus ruminantes é importante para o estabelecimento de protocolos de vacinação adequados que incluam as principais variantes virais em circulação no país. Abordagens de controle envolvendo uma colaboração mais forte entre epidemiologistas, economistas e cientistas serão essenciais para o progresso dos esforços para erradicar a BVD de mais países em todo o mundo (EVANS *et al.*, 2019).

É necessário fornecer conclusões mais robustas para veterinários e para os serviços oficiais de vigilância e saúde pública acerca dos fatores que influenciam a prevalência de BVDV em determinadas regiões do país e para apoiar o planejamento de esforços de intervenção futuros, como possíveis embargos sanitários à produtos de origem brasileira.

Apesar de não ser o foco dessa dissertação, é importante salientar que ao compararmos os índices de produtividade presentes no Norte do Brasil, é possível observar que há uma relação direta entre o número de animais e as áreas de desmatamento da Amazônia legal, onde os maiores rebanhos localizam-se nas áreas mais devastadas. A produtividade animal no rebanho brasileiro aumentou 159% desde a década de 1990, ou seja, o mesmo número de animais está produzindo mais quilos de carne por hectare (ANUALPEC, 2020). No entanto, é possível melhorar mais esses índices produtivos, aliando bem-estar animal e sanidade do rebanho, visando aumentar a produtividade e rentabilidade e reduzir os impactos ambientais, tornando essa cadeia produtiva mais sustentável. Entretanto, os animais só conseguirão atingir o máximo do seu potencial zootécnico se estiverem saudáveis. Através de estudos epidemiológicos é possível identificar as principais enfermidades que acometem os rebanhos brasileiros e a partir disso desenvolver estratégias para manter o rebanho saudável ao invés de aumentar cada vez mais o tamanho dos rebanhos nessas regiões que deveriam ser de preservação ambiental.

Em resumo, este estudo fornece informações epidemiológicas que auxiliam a compreensão dos pestivírus em circulação no Norte e Nordeste do Brasil. Nossos resultados enfatizam a necessidade de monitoramento contínuo do rebanho e investigações adicionais para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e vacinas mais eficazes que poderão contribuir para o controle dos pestivírus no Brasil.

O laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) possui linhas de pesquisa de vírus em bovinos, em especial de pestivírus de ruminantes. No laboratório, não somente é feito o diagnóstico, mas também a identificação dos pestivírus encontrados nas amostras, contribuindo com a pesquisa acerca destes vírus no Brasil (CANAL *et al.*, 1998; WEBER *et al.*, 2014a; 2014b; 2016; SILVEIRA *et al.*, 2017;2018; MOSENA *et al.*, 2017; 2020). Como contribuição à linha de pesquisa do laboratório, nessa dissertação foram descritos:

1. Uma cepa pertencente ao BVDV-1 subgenótipo ‘e’, que foi detectada pela primeira vez no Norte do Brasil, sendo antes somente descrita na região Sul.
2. Duas cepas de HoBiPeV detectadas na região Norte do Brasil.
3. Informações acerca da soroprevalência dos rebanhos da região Norte e Nordeste do Brasil, identificando presença de altos títulos de anticorpos principalmente para HoBiPeV, no Norte; e BVDV-2 no Nordeste.

Cabe ressaltar que esse é o primeiro estudo que, através de uma abordagem sorológica e molecular, traz informações sobre os pestivírus circulantes nos rebanhos da região Norte do Brasil.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS YM. Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. **Nature**. 2013 Feb 7;494(7435):60-4. doi: 10.1038/nature11783. Epub 2013 Jan 13. PMID: 23334420; PMCID: PMC4931921.
- ALMEIDA LL. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. **Res Vet Sci**. 2013 Dec;95(3):901-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.08.009. Epub 2013 Sep 18. PMID: 24079841.
- ALPAY G, TOKER EB, YEŞİLBAĞ K. Persistent BVD virus infections in offspring from imported heifers. **Trop Anim Health Prod**. 2019 Feb;51(2):297-302. doi: 10.1007/s11250-018-1685-5. Epub 2018 Aug 18. PMID: 30121755.
- ANSARI IH. Involvement of a bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. **J Virol**. 2004 Sep;78(18):9612-23. doi: 10.1128/JVI.78.18.9612-9623.2004. PMID: 15331694; PMCID: PMC515013.
- ANZILIERO, D. Resposta sorológica aos herpesvírus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58–63, 2015.
- ARENHART, S. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 736-742, 2009.
- ASKARAVI M. Development of a new method based on unmodified gold nanoparticles and peptide nucleic acids for detecting bovine viral diarrhoea virus-RNA. **AMB Express**. 2017 Dec;7(1):137. doi: 10.1186/s13568-017-0432-z. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28655215; PMCID: PMC5484653.
- AVALOS-RAMIREZ R, Orlich M, Thiel HJ, Becher P. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. **Virology**. 2001 Aug 1;286(2):456-65. doi: 10.1006/viro.2001.1001. PMID: 11485413.
- BACHOFEN C. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Vet Microbiol**. 2008 Sep 18;131(1-2):93-102. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.023. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18424020.
- BACHOFEN C. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Vet Microbiol**. 2010 Mar 24;141(3-4):258-67. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.022. Epub 2009 Sep 25. PMID: 19819088; PMCID: PMC7117366.
- BACHOFEN C. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. **Vet Res**. 2013 a May 15;44(1):32. doi: 10.1186/1297-9716-44-32. PMID: 23675947; PMCID: PMC3660168.
- BACHOFEN C. Bovine Virusdiarrhoe (BVD): von der Biologie zur Bekämpfung [Bovine viral diarrhoea (BVD): from biology to control]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2013 b Nov-Dec;126(11-12):452-61. German. PMID: 24511819.
- BAKER JC. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc*. 1987 Jun 1;190(11):1449-58. PMID: 3038804.
- BAKER JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**. 1995 Nov;11(3):425-45. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30460-6. PMID: 8581856.
- BAUERMANN FV, FLORES EF, RIDPATH JF. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. **J Vet Diagn Invest**. 2012 Mar;24(2):253-61. doi: 10.1177/1040638711435144. PMID: 22379042.
- BAUERMANN FV. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **J Vet Diagn Invest**. 2013 a. Jan;25(1):6-15. doi: 10.1177/1040638712473103. PMID: 23345268.
- BAUERMANN FV. In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhoea viruses 1 and 2. **Vet Microbiol**. 2013 b Sep 27;166(1-2):242-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.b.04.032. Epub 2013 May 20. PMID: 23764273.

- BAUERMANN FV. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. **J Vet Diagn Invest.** 2014 Jan;26(1):10-7. doi: 10.1177/1040638713518208. Epub 2014 Jan 10. PMID: 24415196.
- BAUERMANN FV, FALKENBERG SM, RIDPATH JF. HoBi-Like Virus RNA Detected in Foetuses Following Challenge of Pregnant Cows that had Previously Given Birth to Calves Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Transbound Emerg Dis.** 2017 Oct;64(5):1624-1632. doi: 10.1111/tbed.12556. Epub 2016 Sep 11. PMID: 27615437.
- BAUERMANN FV, RIDPATH JF, DARGATZ DA. A serosurvey for ruminant pestivirus exposure conducted using cattle sera collected for brucellosis surveillance in the United States. **J Vet Diagn Invest.** 2017 Jan;29(1):76-82. doi: 10.1177/1040638716680251. PMID: 28074709.
- BAUERMANN, FV; FLORES EF. Virologia Veterinária - Virologia geral e doenças víricas. Doenças víricas emergentes. In: Virologia Veterinária. 3. ed. Santa Maria: **Editora UFSM**, 2017.p. 1114-1116. 2017.
- BAUERMANN FV, RIDPATH JF. Epidemiology of *Pestivirus H* in Brazil and Its Control Implications. **Front Vet Sci.** 2021 Jul 23; 8:693041. doi: 10.3389/fvets.2021.693041. PMID: 34368280; PMCID: PMC8342886.
- BAZAN JF, FLETTERICK RJ. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1988 Nov;85(21):7872-6. doi: 10.1073/pnas.85.21.7872. PMID: 3186696; PMCID: PMC282299.
- BAXI M. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. **Vet Microbiol.** 2006 Aug 25;116(1-3):37-44. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.03.026. Epub 2006 May 9. PMID: 16687219.
- BECHER P. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. **J Gen Virol.** 1997 Jun;78 (Pt 6):1357-66. doi: 10.1099/0022-1317-78-6-1357. PMID: 9191930.
- BECHER P. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. **J Virol.** 1998 Jun;72(6):5165-73. doi: 10.1128/JVI.72.6.5165-5173.1998. PMID: 9573288; PMCID: PMC110089.
- BECHER P. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology.** 2003 Jun 20;311(1):96-104. doi: 10.1016/s0042-6822(03)00192-2. PMID: 12832207.
- BECHER P, TAUTZ N. RNA recombination in pestiviruses: cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. **RNA Biol.** 2011 Mar-Apr;8(2):216-24. doi: 10.4161/rna.8.2.14514. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21358277.
- BECHER P. Complete Genome Sequence of Bovine Pestivirus Strain PG-2, a Second Member of the Tentative Pestivirus Species Giraffe. **Genome Announc.** 2014 May 15;2(3): e00376-14. doi: 10.1128/genomeA.00376-14. PMID: 24831142; PMCID: PMC4022806.
- BEDENICE D. Long-term clinicopathological characteristics of alpacas naturally infected with bovine viral diarrhea virus type 1b. **J Vet Intern Med.** 2011 May-Jun;25(3):605-12. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0719.x. Epub 2011 Apr 12. PMID: 21488962.
- BIANCHI, M. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010), **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31, 649–655. 2011.
- BIANCHI MV. Natural Outbreak of BVDV-1d-Induced Mucosal Disease Lacking Intestinal Lesions. **Vet Pathol.** 2017 Mar;54(2):242-248. doi: 10.1177/0300985816666610. Epub 2016 Sep 29. PMID: 27586238.
- BIELANSKI A. Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. **Theriogenology.** 2009 Feb;71(3):499-508. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.015. Epub 2008 Oct 1. PMID: 18834622.
- BOLIN SR. Effects of bovine viral diarrhea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. **Am J Vet Res.** 1985 Apr;46(4):884-6. PMID: 3893241.

- BOLIN SR, Ridpath JF. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. **Am J Vet Res.** 1995 Jun;56(6):755-9. PMID: 7653884.
- BOOTH RE. A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. **Vet Res.** 2013 Jun 19;44(1):43. doi: 10.1186/1297-9716-44-43. PMID: 23783173; PMCID: PMC3691640.
- BROCK KV. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **J Vet Diagn Invest.** 1998 Jan;10(1):22-6. doi: 10.1177/104063879801000105. PMID: 9526856.
- BRODERSEN BW. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. **Vet Pathol.** 2014 Mar;51(2):453-64. doi: 10.1177/0300985813520250. Epub 2014 Jan 29. PMID: 24476940.
- BROWNLIE J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Vet Rec.** 1984 Jun 2;114(22):535-6. doi: 10.1136/vr.114.22.535. PMID: 6087539.
- BROWNLIE J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Res Vet Sci.** 1989 May;46(3):307-11. PMID: 2544969.
- BROWNLIE J. 1990. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Rev. Sci. Tech. OIE** 9:43-59. 1990.
- BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES EF. Virologia Veterinária - Virologia geral e doenças víricas. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. F. (3 ed.). Virologia veterinária. Santa Maria: **Editora UFSM**, pg 43-70. 2017.
- CAI, D. Enhanced immune responses to E2 protein and DNA formulated with ISA 61 VG administered as a DNA prime-protein boost regimen against bovine viral diarrhoea virus. **Vaccine**, v. 36, n. 37, p. 5591- 5599, 2018.
- CANAL, C. W. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 2-4, p. 85-97, 1998.
- CARLSSON, U. 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.
- CEPEA-Esalq/USP; CNA, 2020. PIB do agronegócio alcança participação de 26,6% no PIB brasileiro em 2020. **Disponível em:** < <https://www.cnabrazil.org.br/boletins/pib-do-agronegocio-alcanca-participacao-de-26-6-no-pib-brasileiro-em-2020> >. Acesso em: 09 de outubro de 2021.
- CHARLESTON, B. 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, p. 1893-1897, 2001.
- CHAROENLARP W. Spatial and risk factor analysis of bovine viral diarrhoea (BVD) virus after the first-year compulsory phase of BVD eradication programme in Northern Ireland. **Prev Vet Med.** 2018 Sep 1; 157:34-43. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.05.011. Epub 2018 May 19. PMID: 30086847.
- CHILDS T. X. Disease of Cattle - Saskatchewan. **Can J Comp Med Vet Sci.** 1946 Nov;10(11):316-9. PMID: 17648222; PMCID: PMC1661174.
- CHUNG, Y.C. Recombinant E2 protein enhances protective efficacy of inactivated bovine viral diarrhoea virus 2 vaccine in a goat model. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n.1, p. 1-9, 2018.
- CIBULSKI, S. Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. **Vaccine**, v. 36, n. 1, p. 55-65, 2018.
- COLLETT MS. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. **Virology.** 1988 Jul;165(1):200-8. doi: 10.1016/0042-6822(88)90673-3. PMID: 2838958. 1988.

COLLINS, M.E. Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. **Veterinary Microbiology**, v. 138, p. 289-296, 2009.

CORAPI WV. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. **J Virol**. 1988 Aug;62(8):2823-7. doi: 10.1128/JVI.62.8.2823-2827.1988. PMID: 2455820; PMCID: PMC253717.

CORAPI, W. V; FRENCH, T. W; DUBOVI, E. J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v. 63, n. 9, p. 3934-3943, 1989.

CORNISH, T.E. 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.

CORREA, 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. 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. 211-16, 2006.

CTNBio. Technical opinion no. 4594-2016 - Commercial release of vaccine composed by biological risk class I genetically modified microorganism. **Disponível em:** < <http://ctnbio.mctic.gov.br/liberacao-comercial/liberacao-comercial/consultar-processo>>. Acesso em: 09 de outubro de 2021.

DECARO, N. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1549-52, 2011.

DECARO, N. Comparison of the cross-antibody response induced in sheep by inactivated bovine viral diarrhoea virus 1 and Hobi-like pestivirus. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 806-808, 2013.

DENG, R.; BROCK, K. V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. **Nucleic Acids Research**, England, v. 21, n. 8, p. 1949-1957, Apr. 1993.

DENG Y. High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. **Vet Microbiol**. 2012 Oct 12;159(3-4):490-3. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.023. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22613254.

DENG, M. Prevalence study and genetic typing of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in four bovine species in China. **PLoS One** 10, 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0121718. 2015.

DEPNER K. Thermal and pH stability of pestiviruses. **Rev Sci Tech**. 1992 Sep;11(3):885-93. doi: 10.20506/rst.11.3.638. PMID: 1335310. 1992.

DEREGT, D. & LOEWEN, K. G. Bovine viral diarrhoea virus: Biotypes and disease. **The canadian veterinary journal**, v. 36, p. 371-378, 1995.

DEREGT, D. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three antigenic domains involved in neutralization. **Virus Research**, v. 57, n. 2, p. 171-182, 1998.

DIAS, R. K. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 221-228, 2017.

DONOSO A. Genetic diversity of Bovine Viral Diarrhoea Virus from cattle in Chile between 2003 and 2007. **BMC Vet Res**. 2018 Oct 19;14(1):314. doi: 10.1186/s12917-018-1641-7. PMID: 30340596; PMCID: PMC6194550.

DOWNEY-SLINKER, E. D. Antibody titers to vaccination are not predictive of level of protection against a BVDV type 1b challenge in *Bos indicus* - *Bos taurus* steers. **Vaccine**, v. 34, n. 42, p. 5053-5059, 2016.

DUBOVI EJ. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**. 2013 Jan;41(1):8-13. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.06.004. Epub 2012 Jul 15. PMID: 22796482.

- EVANS CA. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. **Transbound Emerg Dis.** 2019 Mar;66(2):640-652. doi: 10.1111/tbed.13068. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30415496.
- EVERMANN, J. F. Clinical features. In: S. M. Goyal and J. F. Ridpath (eds), *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*, pp. 105-119. **Blackwell Publishing**, Ames, IA. 2005.
- FAIRBANKS K. Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhoea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge. **Vet Ther.** 2003 Spring;4(1):24-34. PMID: 12756633.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO STAT - Livestock Primary. Roma, Italy, 2019. **Disponível em:** <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 28 setembro de 2021.
- FIRTH, C. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1–16, 2014.
- FLORES, E.F. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, p. 51-60, 2002.
- FLORES E.F. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil Viral – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 25 (3): 125–134. 2005.
- FLORES EF; CARGNELUTTI JF. Virologia Veterinária - Virologia geral e doenças víricas. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: *Virologia Veterinária*. 3. ed. Santa Maria: **Editores UFSM**, 2017.p. 319-357. 2017.
- FRAY M.D. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Anim. Reprod. Sci.** 60/61:615-627. 2000.
- FULTON, R. W. Humoral immune response and assessment of vaccine virus shedding in calves receiving modified live virus vaccines containing bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus 1a. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 50, n. 1, p. 31–37, 2003.
- FULTON, R.W. 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. 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.
- FULTON, R. W. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 4, p. 464–477, 2009.
- GAO, S. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. **Veterinary Microbiology**, v. 163, p. 172-176, 2013.
- GETHMANN, J. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. **Heliyon**, 1, e00019, doi: 10.1016/j.heliyon. 2015.
- GIAMMARIOLI, M. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 231–236, 2011.
- GIAMMARIOLI, M. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. **Biologicals**, v. 43, n. 4, p. 220–224, 2015.
- GIVENS, M.D. Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the Southeastern United States. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 145-155, 2003.
- GIVENS, M.D. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 42-51, 2009.

- GHASEMI MONJEZI, S. Enzyme-free amplification and detection of bovine viral diarrhoea virus RNA using hybridization chain reaction and gold nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8913–8921, 2016.
- GLADUE, D. P. Classical Swine Fever Virus p7 Protein Is a Viroprotein Involved in Virulence in Swine. **Journal of Virology**, v. 86, n. 12, p. 6778–6791, 2012.
- GOMEZ-ROMERO. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus in cattle from Mexico. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 2017, Vol. 29(3) 362-365.
- GREISER-WILKE, I. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**. 2003 Jun;31(2):113-8. doi: 10.1016/s1045-1056(03)00025-3. PMID: 12770541.
- GRISSETT, G. P. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. **J Vet Intern Med**, 29, 770-780, doi: 10.1111/jvim.12597. 2015.
- GROOMS DL, Keilen ED. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. **Clin Diagn Lab Immunol**. 2002 Jul;9(4):898-900. doi: 10.1128/cdli.9.4.898-900.2002. PMID: 12093692; PMCID: PMC120018.
- GROOMS, D.; BAKER, J. C.; AMES, T. R. Doenças causadas pelo vírus da diarreia viral bovina. In: SMITH BP. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3ª ed., São Paulo: Manole, 2006, p.707-714.
- GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 5–19, 2004.
- GUO, K.K. Identification of two internal signal peptide sequences: critical for classical swine fever virus non-structural protein 2 to trans-localize to the endoplasmic reticulum. **Virology Journal**, v. 8, p. 1–7, 2011.
- 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.
- HAUSE, B. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the United States. **Journal of General Virology**, v. 96, p. 2994-2998, 2015.
- HEFFERNAN, C. Analysis of Pan-European attitudes to the eradication and control of bovine viral diarrhoea. **The Veterinary Record**, v.164, n.6, p.163-167, 2009.
- HILTON L. The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. **J Virol**. 2006.
- HOFFMANN, B. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.136, p.200-209, 2006.
- HORZINEK, M. C. The structure of togaviruses. **Progress in Medical**, v. 16, p. 109-56, 1973.
- HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 89–107, 1999.
- HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, p. 137–143, 2003.
- HOUE, H. Risk Assessment. In: S. M. Goyal and J. F. Ridpath (eds), Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control, pp. 35-64. **Blackwell Publishing Ames**, IA. 2005.
- HOUE H. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **J Vet Diagn Invest** 18:427–436. 2006.
- ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**; 98:2–3, 2017.
- ICTV. Virus Taxonomy: 2020 Release EC 52, Online meeting, October 2020. **Disponível em:** <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/flaviviridae/361/genus-pestivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/flaviviridae/361/genus-pestivirus)>. Acesso em: 02 de outubro de 2021.

- JENCKEL, M. Mixed Triple: Allied Viruses in Unique Recent Isolates of Highly Virulent Type 2 Bovine Viral Diarrhea Virus Detected by Deep Sequencing. **Journal of Virology**, v. 88, n. 12, p. 6983–6992, 2014.
- KAHN, C.M. Manual Merck de Veterinária. 6 ed. Barcelona, España: **Editorial Océano**, 2007, p.215-218.
- KALAIYARASU, S. Molecular characterization of recent Hobi-like pestivirus isolates from cattle showing mucosal disease-like signs in India reveals emergence of a novel genetic lineage. **Transbound Emerg Dis.** <https://doi.org/10.1111/tbed.13981>. 2021
- KALAYCIOGLU, A. T. The Characterization of the Neutralizing Bovine Viral Diarrhea Virus Monoclonal Antibodies and Antigenic Diversity of E2 Glycoprotein. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 9, p. 1117–1120, 2012.
- KAPIL, S. Immunity and Immunosuppression. In: S. M. Goyal and J. F. Ridpath (eds), Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control, pp. 157-170. **Blackwell Publishing**, Ames, IA. 2005.
- KIM SG. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. **Biologicals**. 2003 Jun;31(2):103-6. doi: 10.1016/s1045-1056(03)00023-x. PMID: 12770539.
- KIMMAN, T. G. Cellular Immune Response to Hog Cholera Virus (HCV): T Cells of Immune Pigs Proliferate In Vitro upon Stimulation with Live HCV, but the E1 Envelope Glycoprotein Is Not a Major T-Cell Antigen. **Journal of Virology**, v. 67, n. 5, p. 2922–2927, 1993.
- KIRKLAND, P. D. Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. **Virus Research**, v. 129, n. 1, p. 26–34, 2007.
- KREY T. Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. **J Virol**. 2006 Apr;80(8):3912-22. 2006.
- KREY T. Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein E(rns) and mechanistic analysis of its ribonuclease activity. **Structure**. 2012 May 9;20(5):862-73. 2012.
- KUMMERER, B. M. & MEYERS, G. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. **Journal of Virology**, v. 74, p. 390–400, 2000.
- LACKNER, T.; THIEL, H.; TAUTZ, N. Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 5110–5115, 2006.
- LANYON, S.R. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v.199, p.201-209, 2014.
- LAUDE H. Nonarbo-togaviridae: comparative hydrodynamic properties of the pestivirus genus. Brief report. **Arch Virol**. 1979;62(4):347-52. doi: 10.1007/BF01318109. PMID: 232414. 1979.
- LAUREYNS, J. What are the monetary losses by BVDV infection and is control cost-effective. **Veterinary Journal**, v. 223, p. 32–33, 2017.
- LEE, K. M; GILLESPIE, J. H. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, p. 952-2, 1957.
- LIANG, D. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 5, p. 1269–1274, 2003.
- 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. **J Vet Diagn Invest**. 2004 Sep;16(5):388-96. doi: 10.1177/104063870401600504. PMID: 15460320.
- LINDBERG, A. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 25, n. 3, p. 961–979, 2006.

- LINDENBACH B.D. Flaviviridae: the viruses and their replication. in: Knipe D.M. Howley P.M. **Fields Virology**. Fifth Edition. Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA. 1101-1152. 2007.
- LING, S. Cellular Hsp27 interacts with classical swine fever virus NS5A protein and negatively regulates viral replication by the NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Virology**, v. 518, n. 666, p. 202–209, 2018.
- LIU, L. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. **Journal of Virological Methods**, v. 154, n. 1–2, p. 82–85, 2008.
- LIU L. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04\_KhonKaen. **Vet Microbiol**. 2009 Jul 2;138(1-2):62-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.006. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19349128.
- LIU, L. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of pestivirus phylogeny. **Virus Research**, v. 147, n. 1, p. 47–52, 2010.
- LOKHANDWALA, S. Priming cross-protective bovine viral diarrhea virus-specific immunity using live-vectored mosaic antigens. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–23, 2017.
- LOY, J. D. Development and evaluation of a replicon particle vaccine expressing the E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cattle. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.
- MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Flaviviridae. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. (Eds.). Fenner's Veterinary Virology. 4. ed. **London: Academic Press**, 2011. p. 467–481
- MAHONY, T. J. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1–2, p. 1–6, 2005.
- MAPA- Reconhecimento Internacional Brasil livre da Aftosa- OIE, 2018. **Disponível em:** < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/brasil-livre-da-aftosa/documentos/folder-brasil-livre-da-aftosa> > 2018. Acesso em 03 de agosto de 2021.
- MAURER K. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. **J Virol**. 2004 Feb;78(4):1792-9. doi: 10.1128/jvi.78.4.1792-1799.2004. PMID: 14747544; PMCID: PMC369467. 2004.
- MAYA L. Molecular diversity of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. **Arch Virol** 161:529–535. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>. 2016. 2016.
- MEYERS, G. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. **Virology**, v. 191, p. 368–386, 1992.
- MEYERS G. Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. **J Virol**. 2007.
- MEYLING A, HOUE H, JENSEN AM. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. **Rev Sci Tech**. 1990 Mar;9(1):75-93. doi: 10.20506/rst.9.1.489. PMID: 2132155.
- MILLER, M. A. Effect of delayed or prolonged fixation on immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in ear-notch biopsies. **Annual meeting, american association of veterinary laboratory diagnosticians**. Greensboro, North Carolina, 2004.
- MISHRA N. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. **Vet Microbiol**. 2014 Nov 7;174(1-2):239-46. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.017. Epub 2014 Sep 30. PMID: 25301283.
- MOENNIG, V; BROWNLIE, J. Vaccines and vaccination strategies. EU thematic network on control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). BVDV control position paper. 2001.
- MOENNIG, V.; HOUE, H; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Anim. Health. Res. Rev.** 6, 63–74. 2005.



- MÓSENA ACS. Genomic and antigenic relationships between two 'HoBi'-like strains and other members of the Pestivirus genus. **Arch Virol.** 2017 Oct;162(10):3025-3034. doi: 10.1007/s00705-017-3465-3. Epub 2017 Jul 1. PMID: 28669036.
- MURRAY, C. L. Bovine Viral Diarrhea Virus Core Is an Intrinsically Disordered Protein That Binds RNA. **Journal of Virology**, v. 82, n. 3, p. 1294–1304, 2008.
- NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, p. 2–7, 2013.
- NEWCOMER, B. W.; GIVENS, M. D. Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhea, classical swine fever and border disease. **Antiviral Research**, v. 100, n. 1, p. 133–150, 2013.
- NEWCOMER B.W. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. **Vet Microbiol.** 2017 Jul; 206:78-83. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.003. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28400145.
- OGUZOGLU, T. C. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup? **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 3–4, p. 374–379, 2009.
- OIE. Bovine viral diarrhoea Chapter 3.4.7. 2018. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. **Disponível em:** < <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/> > Acesso em:15 de agosto de 2021.
- OIE. List of FMD free Member Countries, 2021: **Disponível em:** < <https://www.oie.int/en/disease/foot-and-mouth-disease> > Acesso em: 13 de setembro de 2021.
- OIE. listed diseases, infections and infestations in force in 2020. **Disponível em:** < <https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/>>. Acesso em: 28 de agosto de 2021.
- OLAFSON, P. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Vet**, v. 36, p. 205-13, 1946.
- OTONEL, R. A. A. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 87–92, 2014.
- PASSLER, T.; WALZ, P. H. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. **Animal health research reviews**, v. 11, p. 191–205, 2010.
- PECORA, A. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 204–212, 2014.
- PECORA, A. Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 1, p. 4–8, 2015.
- PELLERIN, C., J. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, 203, 260-268. 1994.
- PETERHANS, E. Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts. **Vet Microbiol**, 142, 18-25, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.038. 2010.
- PETERHANS E. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Vet Res.** 44-46. 2010.
- PINIOR, B.; FIRTH, C. L.; RICHTER, V. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 137, p. 77-92, 2017.
- PIZARRO-LUCERO, J. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1–3, p. 208–217, 2006.
- PLATT, R. Comparison of humoral and T-cell-mediated immune responses to a single dose of Bovela® live double deleted BVDV vaccine or to a field BVDV strain. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 187, p. 20–27, 2017.

- POCOCK, D.H. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. **Archives of Virology**, v. 94, p. 43-53, 1987.
- POOLE, T. O. N. Pestivirus Translation Initiation Occurs by Internal Ribosome Entry. **Virology**, v. 206, p. 750–754, 1995
- QUINCOZES, C.G. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul, Semina: **Ciências Agrárias**, 28, 269–276. 2007.
- QUINET, C. First results in the use of bovine ear notch tag for bovine viral diarrhoea virus detection and genetic analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–18, 2016.
- RADOSTITS O.M. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. **Can Vet J**. 1988 Jun;29(6):513-28. PMID: 17423063; PMCID: PMC1680792.
- RADOSTITS O.M. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed., **Saunders-Elsevier**, Edinburgh. 2156 p. 2007.
- RAMSEY, F. K; CHIVERS, W. H. Mucosal disease of cattle. **North Am Vet**, v. 34, p. 629-33, 1953.
- RAWLINGS, N. D. The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 343–350, 2012.
- REARDON, F. Quantifying the role of Trojan dams in the between-herd spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDv) in Ireland. **Preventive veterinary medicine**, 152, 65-73. 2018.
- REICHEL, M.; LANYON, S.; HILL, F. Perspectives on Current Challenges and Opportunities for Bovine Viral Diarrhoea Virus Eradication in Australia and New Zealand. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 14, 2018.
- RICHTER, V. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary journal**, 220, 80-87, doi: 10.1016/j.tvjl.2017.01.005. 2017.
- RIDPATH, J. F; BOLIN, S. R; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74, 1994.
- RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105–121, 2010.
- RIDPATH J. Preventive strategy for BVDV infection in North America. **J Vet Res**. PMID: 22458199. 2012.
- RIDPATH JF; BAUERMANN FV; FLORES, EF (Ed). Virologia Veterinária - Virologia geral e doenças víricas. *Flaviviridae*. In: Virologia Veterinária. 3. ed. Santa Maria: **Editora UFSM**, 2017.p. 677-705. 2017.
- RINCK, G. A Cellular J-Domain Protein Modulates Polyprotein Processing and Cytopathogenicity of a Pestivirus. **Journal of virology**, v. 75, p. 9470–9482, 2001.
- RONECKER, S. Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 9, p. 2114–2121, 2008.
- RUGGLI N. N(pro) of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction. **Virology**. 2005 Sep 30;340(2):265-76. doi: 10.1016/j.virol.2005.06.033. PMID: 16043207.
- SANDVIK. T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 123-34, 1999.
- SANDVIK T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Prev Vet Med**. 2005 Nov 15;72(1-2):3-16; discussion 215-9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.08.015. Epub 2005 Sep 13. PMID: 16168503.
- SCHARNBÖCK, B. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. **Scientific Reports**, v. 26, p. 14420, 2018.

- SCHIRRMEIER, H. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3647–3652, 2004.
- SCHIRRMEIER U. Three years of mandatory BVD control in Germany – lessons to be learned. Proceedings of the **XXVIII World Buiatrics Congress Cairns**, Australia: pp 245–248. 2014.
- SCHNEIDER R. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. **Science**. 1993 Aug 27;261(5125):1169-71. doi: 10.1126/science.8356450. PMID: 8356450.
- SCHWEIZER M. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. **J Virol**. 2001 May;75(10):4692-8. doi: 10.1128/JVI.75.10.4692-4698.2001. PMID: 11312340; PMCID: PMC114223.
- SCHWEIZER, M. Pestiviruses. **Annual Review of Animal Biosciences**, 2, 141-163. 2014.
- SCHWEIZER M. Eradication of Bovine Viral Diarrhoea (BVD) in Cattle in Switzerland: Lessons Taught by the Complex Biology of the Virus. **Front Vet Sci**. 7; 8:702730. doi: 10.3389/fvets.2021.702730. PMID: 34557540; PMCID: PMC8452978. 2021.
- SHI, H., Kan, Y., Yao, L., Leng, C., Tang, Q., Ji, J. and Sun, S. Identification of Natural Infections in Sheep/Goats with HoBi-like Pestiviruses in China. **Transbound Emerg Dis**, 63: 480-484. <https://doi.org/10.1111/tbed.12551>. 2016.
- SILVA, P.H.H. Sobre a necessidade de inclusão de pestivírus *HoBi-like* em vacinas respiratórias e reprodutivas para bovinos. Santa Maria, RS. 2021. 58f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução Animal) - **Universidade Federal de Santa Maria-UFSM**, Santa Maria, RS. 2021.
- SILVEIRA S. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. **Transbound Emerg Dis**. 2017 Apr;64(2):613-623. doi: 10.1111/tbed.12427. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26415862.
- SILVEIRA, S. HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. **Transbound Emerg Dis**, 65, e113–e120. <https://doi.org/10.1111/tbed.12689>. 2018.
- SIMMONDS, P. Family *Flaviviridae*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E. (eds), **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2011, p. 1003–1020.
- SIMMONDS, P.; ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*. **Journal of General Virology**, 98:2–3. 2017.
- SMITH, D.B. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. **J. Gen. Virol.** 98, 2106–2112. 2017.
- SOLTIS, D. Studies on the nature of heat-labile anti-complementary activity in normal human serum, **Clin. Exp. Immunol.**, 1979, 37(2), 310.
- SPETTER et al. Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhoea virus in Argentina. **Infection, Genetics and Evolution**. 105089. 2021.
- STÅHL, K. Atypical “HoBi”-like pestiviruses-recent findings and implications thereof. **Vet. Microbiol.** 142, 90–93. 2007.
- STÅHL, K. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.41-44, 2009.
- STÅHL K. BVDV control and eradication in Europe - an update. **Jpn J Vet Res**. 60: S31–S9. 2012.
- STALDER, H. P. et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 37–41, 15 nov. 2005.
- STARK, R. Processing of Pestivirus Polyprotein: Cleavage Site between Autoprotease and Nucleocapsid Protein of Classical Swine Fever Virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 7088–7095, 1993.

- TAO, J. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. **Veterinary microbiology**, v. 165, p. 185–9, 2013.
- TAUTZ, N. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathic pestivirus generated by an internal deletion. **Journal of Virology**, v. 68, p. 3289-3297, 1994.
- TAUTZ, N. Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. **Journal of Virology**, v. 70, p. 7851–7858, 1996.
- TAUTZ, N. The Molecular Biology of Pestiviruses. **Adv Virus Res.** 93:47-160. doi: 10.1016/bs.aivir.2015.03.002. Epub. PMID: 26111586. 2015.
- THABTI, F. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. **Archives of Virology**, v. 150, n. 2, p. 215–229, 2005.
- THIEL, H. Hog Cholera Virus: Molecular Composition of Virions from a Pestivirus. **Journal of Virology**, v. 65, n. 9, p. 4705–4712, 1991.
- THOMANN, B. Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 145, p. 1–6, 2017.
- THOMPSON, J. A. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, n. 3–4, p. 290–301, 2006.
- THULKE, H. H. Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 150, p. 151–161, 2018.
- THURMOND, M. C. Virus Transmission. In: S. M. Goyal and J. F. Ridpath (eds), Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control, pp. 91-104. **Blackwell Publishing**, Ames, IA. 2005.
- TURNER, C. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 1113–1124, 2004
- USDA-FAS- Brazil: Livestock and Products Annual, 2020. **Disponível em:** <<https://www.fas.usda.gov/data/brazil-livestock-and-products-annual-8>> Acesso em: 13 de setembro de 2021.
- VAN CAMPEN, H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 94–98, 2010.
- VILCEK, S. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Arch Virol.** 146(1):99-115. doi: 10.1007/s007050170194. PMID: 11266221. 2001.
- VILCEK, S. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, n. 1–2, p. 187–193, 2005 a.
- VILCEK, S. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1–2, p. 31–35, 2005 b.
- VILCEK, S. Pestiviruses in wild animals. **Vet Microbiol.** 2006 Aug 25;116(1-3):1-12. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.06.003. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16839713.
- VILCEK, S. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Arch Virol.** 136:309–323. 1994.
- VOGEL, F.S.F. 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.
- WALZ, P. H. Comparison of reproductive protection against bovine viral diarrhoea virus provided by multivalent viral vaccines containing inactivated fractions of bovine viral diarrhoea virus 1 and 2. **Vaccine**, v. 36, n. 26, p. 3853–3860, 2018.

- WEBER, M. N. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v. 191, p. 117–124, 2014a.
- WEBER, M. N. Bovine viral diarrhoea in Brazil: current status and future perspectives. **British Journal of Virology**, v. 1, p. 92–97, 2014b.
- WEBER, M. N. Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with “HoBi” -like Pestivirus in a Field Outbreak. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, 2016.
- WEINSTOCK, D. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. **J. Clin. Microbiol.** 39, 343–346. 2001.
- WEISKIRCHER, E. Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. **Virology Journal**, v. 6, p. 1–15, 2009.
- WERNIKE K. Eradication of bovine viral diarrhoea virus in Germany - diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. **Vet Microbiol.** 208:25–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.009. 2017.
- WU, Z. Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces. **Journal of Virology**, v. 86, n. 20, p. 10999–11012, 2012.
- YARNALL, M.J. Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: a systematic review of economic impact. **Vet Rec** 181(13):347. <https://doi.org/10.1136/vr.104370>. 2017.
- YEŞİLBAĞ, K.; ALPAY, G.; BECHER, P. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Viruses**. 2017 May 26;9(6):128. doi: 10.3390/v9060128. PMID: 28587150; PMCID: PMC5490805. 2017.
- ZÜRCHER, C. Prolonged activity of the pestiviral RNase Erns as an interferon antagonist after uptake by clathrin-mediated endocytosis. **J Virol.** doi: 10.1128/JVI.00672-14. Epub 2014 Apr 16. PMID: 24741078; PMCID: PMC4054414. 2014.

## 7. CURRICULUM VITAE

**BAUMBACH, L.F.**

**(L.F. BAUMBACH; L BAUMBACH; BAUMBACH, LETÍCIA FERREIRA)**

### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Letícia Ferreira Baumbach

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 07 de junho de 1992.

**Endereço profissional:** Laboratório de Virologia Veterinária (LabViroVet), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 9090, Prédio 42.602, CEP 91540-000, Porto Alegre (RS), Brasil.

### 2. FORMAÇÃO

Bacharelado em Medicina Veterinária- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, 2019

### 3. ESTÁGIOS

**2019 – 2019:** Estágio Curricular Supervisionado no Laboratório Veterinário Axys Análises. Ênfase em diagnóstico laboratorial, sorologia, microbiologia, cultivo celular e biologia molecular. Total 480 h.

**2016 – 2019:** Bolsista de iniciação científica no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, com ênfase em sorologia, microbiologia, cultivo celular e biologia molecular.

**2017 – 2018:** Atividade de extensão. Atendimento Veterinário em Exposições Agropecuárias no Rio Grande Do Sul- Setor De Grandes Ruminantes- UFRGS.

**2014 – 2015:** Bolsista de iniciação científica do Laboratório de Reprodução de Bovinos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, com ênfase em fisiopatologia da reprodução, coleta e congelamento de sêmen bovino, métodos de diagnóstico gestacional, inseminação artificial e inseminação artificial a tempo fixo em bovinos de corte e leite.

**2013 – 2013:** Estágio Voluntário no Setor de Nutrição de Pequenos Animais do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. Programa De Oportunidades Acadêmicas do HCV- UFRGS.

**2013 – 2013:** Estágio realizado no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, no setor de grandes animais, com ênfase em nutrição animal e clínica médica e cirúrgica.

#### 4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

**2021** Prêmio de Melhor E-Pôster, na área de Virologia Veterinária no XXXII Congresso Brasileiro de Virologia. Trabalho intitulado “Detection, genetic characterization and serology of ruminant pestiviruses in cattle from Northern Brazil.”

**2017** Destaque na modalidade apresentação oral e poster, no XXIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS-SIC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Trabalho intitulado: “Detecção e caracterização de hepacivírus em bovinos da região Nordeste do Brasil.”

**2016** Destaque na modalidade apresentação oral e poster, no XXVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS-SIC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Trabalho intitulado: “Detecção de pestivírus em ruminantes do Nordeste brasileiro.”

#### 5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

G.M Breyer<sup>1</sup>; M.E. Dias<sup>1</sup>; L.C. Henker<sup>3</sup>; M.P. Lorenzetti<sup>2</sup>; L. F. Baumbach<sup>3</sup>; C.W. Canal<sup>3</sup>; S.P. Pavarini<sup>2</sup> & F.M. Siqueira<sup>1</sup>. *Campylobacter fetus* in Abomasal Fluid from Spontaneously Aborted Bovine and Ovine Fetuses. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2021. 49: 1834.

Alves RS, do Canto Olegário J, Weber MN, da Silva MS, Canova R, Sauthier JT, Baumbach LF, Witt AA, Varela APM, Mayer FQ, da Fontoura Budaszewski R, Canal CW. Detection of coronavirus in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in southern Brazil. **Transbound Emerg Dis**. 2021 May 12:10.1111/tbed.14150. doi: 10.1111/tbed.14150. Epub ahead of print. PMID: 33977671; PMCID: PMC8242716.

Weber MN, Mosena ACS, Baumbach LF, da Silva MS, Canova R, Dos Santos DRL, Budaszewski RDF, de Oliveira LV, Soane MM, Saraiva NB, Bellucco FT, Mazurek BA, Diehl GN, Gil LHVG, Borba MR, Corbellini LG, Canal CW. Serologic evidence of West Nile virus and Saint Louis encephalitis virus in horses from Southern Brazil. **Braz J Microbiol**. 2021 Jun;52(2):1021-1027. doi: 10.1007/s42770-021-00474-7. Epub 2021 Apr 2. Erratum in: *Braz J Microbiol*. 2021 Apr 28; PMID: 33797731; PMCID: PMC8105465.

Móseno ACS, Weber MN, Cibulski SP, Silva MS, Paim WP, Silva GS, Medeiros AA, Viana NA, Baumbach LF, Puhl DE, Silveira S, Corbellini LG, Canal CW. Survey for pestiviruses in backyard pigs in southern Brazil. **J Vet Diagn Invest**. 2020 Jan;32(1):136-141. doi: 10.1177/1040638719896303. Epub 2020 Jan 10. PMID: 31924139; PMCID: PMC7003213.

Weber MN, Mosena ACS, da Silva MS, Canova R, de Lorenzo C, Olegário JC, Budaszewski RF, Baumbach LF, Soares JF, Sonne L, Varela APM, Mayer FQ, de Oliveira LGS, Canal CW. Virome of crab-eating (*Cerdocyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) from southern Brazil and Uruguay. **Infect Genet Evol**. 2020 Nov; 85:104421. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104421. Epub 2020 Jun 21. PMID: 32580027; PMCID: PMC7306396.

de Cecco BS, Lorenzetti MP, Henker LC, Weber MN, Moséna ACS, Baumbach L, Canal CW, Driemeier D, Pavarini SP, Sonne L. Detection of enzootic nasal tumor virus (ENTV) in a sheep flock in southern Brazil.

**Trop Anim Health Prod.** 2019 Sep;51(7):2095-2098. doi: 10.1007/s11250-019-01897-z. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30997630.

Da Silva MS, Weber MN, Baumbach LF, Cibulski SP, Budaszewski RF, Mósena ACS, Canova R, Varela APM, Mayer FQ, Canal CW. Highly divergent cattle hepacivirus N in Southern **Brazil**. **Arch Virol.** 2019 Dec;164(12):3133-3136. doi: 10.1007/s00705-019-04419-2. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31563979.

Weber MN, Cibulski SP, Olegário JC, da Silva MS, Puhl DE, Mósena ACS, Alves CDBT, Paim WP, Baumbach LF, Mayer FQ, Fernandes ARF, Azevedo SS, Canal CW. Characterization of dog serum virome from Northeastern **Brazil**. **Virology.** 2018 Dec; 525:192-199. doi: 10.1016/j.virol.2018.09.023. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30292963.

da Silva MS, Junqueira DM, Baumbach LF, Cibulski SP, Mósena ACS, Weber MN, Silveira S, de Moraes GM, Maia RD, Coimbra VCS, Canal CW. Comprehensive evolutionary and phylogenetic analysis of Hepacivirus N (HNV). **J Gen Virol.** 2018 Jul;99(7):890-896. doi: 10.1099/jgv.0.001082. Epub 2018 May 24. PMID: 29792591.

Silveira S, Baumbach LF, Weber MN, Mósena ACS, da Silva MS, Cibulski SP, Borba MR, Maia RD, Coimbra VCS, de Moraes GM, Ridpath JF, Canal CW. HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. **Transbound Emerg Dis.** 2018 Feb;65(1):e113-e120. doi: 10.1111/tbed.12689. Epub 2017 Jul 30. PMID: 28758367.

M.R. Almeida; SILVA, E. P.; BAUMBACH, L. F.; MACHADO, A. B.; MARONNA, M. D.; GAMBIN, L. S.; VELHO, F. A.; BORGES, J. B. S.Efeito da aplicação de benzoato de estradiol ou da Gonadotrofina Coriônica humana em protocolos de ressincronização da ovulação sobre a prenhez da IATF. **ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE.** v.43, p.1 - 4, 2015.

## **6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

**2021 XXXII Congresso Brasileiro de Virologia.** Trabalho intitulado “Detection, genetic characterization and serology of ruminant pestiviruses in cattle from Northern Brazil.”

**2020 XXXI Congresso Brasileiro de Virologia.** Trabalho intitulado “Detection and Genetic Characterization of Ruminant Pestiviruses in Cattle from Northern Brazil.”

**2018 XXIX Congresso Brasileiro de Virologia.** Trabalho intitulado “Detection of Ovine Enzootic Nasal Tumor Virus (Entv-1) in Brazil.”