

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

SOROLOGIA COMPARATIVA PARA PESTIVÍRUS EM RUMINANTES
PROVENIENTES DE REBANHOS DO NORTE DO BRASIL

LEONARDO REIS LOBRAICO DA SILVA

Porto Alegre

2020/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

SOROLOGIA COMPARATIVA PARA PESTIVÍRUS EM RUMINANTES
PROVENIENTES DE REBANHOS DO NORTE DO BRASIL

Autor: Leonardo Reis Lobraico da Silva

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Coorientadora: Letícia Ferreira Baumbach

PORTO ALEGRE

2020/1

Leonardo Reis Lobraico da Silva

**SOROLOGIA COMPARATIVA PARA PESTIVÍRUS EM RUMINANTES
PROVENIENTES DE REBANHOS DO NORTE DO BRASIL**

Aprovado em 23/11/2020

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof.^a Dra. Franciele Maboni
Membro da Comissão

Prof.^a Dra. Marisa Cardoso
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de dedicar não apenas este trabalho, como a conquista da graduação em Medicina Veterinária para meus pais: José Roberto Lobraico da Silva e Maria Teresa Reis Silva. Meus pais, que por diversos motivos não tiveram a chance de cursar o ensino superior e desde cedo tiveram que trabalhar, tendo de deixar os estudos de lado. Tenho certeza que se hoje eu estou perto de me tornar médico veterinário, foi porque sempre fizeram de tudo e trabalharam muito para me proporcionar as ferramentas para que eu chegasse até aqui.

Aos meus familiares, principalmente meus dindos, Rosane Lobraico Jung e João Carlos Jung e avó Rosa Lobraico da Silva, por todo o suporte e companheirismo que sempre tiveram conosco. Proporcionando não só a mim, como meu irmão, Lucas Reis Lobraico da Silva, momentos únicos e que para sempre ficarão na minha lembrança. Ao meu tio Hélio Blume e primo Guilherme Blume por servirem de inspiração e referências profissionais.

A toda equipe do Laboratório de Virologia Veterinária, da Faculdade de Veterinária, da UFRGS (Ana Cristina, Christian, Dani, Gaby, Jéssica, Juliana, Letícia, Manu, Mari, Matheus, Raíssa, Re, Raquel, Samuel, Simone, Vitória e Will). Muito obrigado por todos os momentos e aprendizado que me proporcionaram desde a minha chegada ao Laboratório, em agosto de 2017. Além de um agradecimento especial para o meu orientador, Cláudio Wageck Canal, por ter me recebido e permitido fazer parte desta equipe; e minha coorientadora, Letícia Baumbach, por compartilhar parte do seu projeto de mestrado comigo, além do apoio e auxílio para solucionar as diversas dúvidas que surgiram ao longo deste trabalho.

Aos amigos da época de colégio, Luisa, Paula, Vick e Tami, pela nossa amizade de mais de uma década, pelos nossos almoços comendo pastel no bar ou cachorro quente do Rosário. Muito obrigado pelo companheirismo de todos esses anos e que certamente levaremos por muitos outros mais.

Aos amigos que a faculdade me proporcionou e que tenho certeza que levarei para além dela: Bianca, Elisar, Gabi, Giulia, Juliana, Luiza, Karina, Mariana e Thiago. Obrigado por todos os momentos que vivemos, ter a companhia de vocês ao longo de toda a faculdade fez com que os últimos cinco anos e meio passassem mais rápido do que eu gostaria. Hoje penso em todos os “perrengues” que passamos ao longo da graduação, desde pegar o D43 para ir da aula de bioquímica até a FAVET para assistir as aulas de anatomia, passar as tardes de quarta e sexta decorando “origem, inserção e ação” dos músculos, e sair correndo após a

chamada para não perder o ônibus de volta pra casa. Mesmo considerando todos estes contratempos e nos diversos outros que a faculdade nos proporcionou, voltaria no tempo só para revivê-los ao lado de vocês.

RESUMO

O Brasil detém atualmente o maior rebanho bovino comercial do mundo, e a bovinocultura representa um dos principais segmentos da economia nacional. O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante causador de perdas produtivas, reprodutivas e econômicas na bovinocultura do Brasil e do mundo. Seus principais impactos estão relacionados com abortos, redução no ganho de peso e aumento de tempo para o abate. Os bovinos infectados tendem a apresentar quadro subclínico, podendo em alguns casos, cursar com sinais respiratórios, reprodutivos e digestivos. O BVDV pertence ao gênero *Pestivirus* e é membro da família *Flaviviridae*. As espécies de maior importância na bovinocultura mundial são o vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1), vírus da diarreia viral bovina tipo 2 (BVDV-2) e HoBi-like (BVDV-3). Este trabalho tem como objetivo investigar a diversidade de pestivírus de ruminantes em bovinos da Região Norte do Brasil (estados do PA, AM, RR, AP). Para isto, realizou-se RT-PCR de 944 amostras de soro bovino, seguido de sequenciamento genético utilizando o método de Sanger, além da soroneutralização (SN) comparativa de 390 amostras. Na RT-PCR, os soros foram analisados primeiramente em *pools*, e os *pools* positivos foram analisados individualmente. A RT-PCR detectou três animais positivos (0,31%) e a análise filogenética identificou espécies de BVDV-1e (1 amostra) e BVDV-3 (2 amostras). Este trabalho é parte de um projeto que se encontra em andamento e os resultados de SN apresentados aqui são parciais. Até o momento, 75 amostras foram testadas para a presença de anticorpos contra uma cepa de BVDV-2, sendo que 42 (56,0%) delas foram positivas, enquanto 33 (44,0%) não tiveram anticorpos detectados para a mesma espécie. As próximas etapas serão destinadas para a testagem das demais amostras para BVDV-2, seguido de BVDV-1 e BVDV-3. Os dados encontrados até o momento contribuem para um melhor entendimento das espécies circulantes na Região Norte do Brasil, reforçando a necessidade de revisão de vacinas considerando as espécies presentes em cada região do País.

Palavras-chave: BVDV; Soroneutralização; Bovino; Pestivírus; Anticorpo

ABSTRACT

Brazil owns the largest commercial cattle herd in the world, and has cattle farming as a sector of great importance in its economy. The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is an important cause of productive, reproductive and economic losses in cattle farming in Brazil and in the world. Their main impacts are related to abortions, reduced weight gain and increased time for slaughter. Infected cattle tend to have a subclinical, and in some cases may be accompanied by respiratory, reproductive and digestive signs. These viruses belong to the genus Pestivirus of the Flaviviridae family. The species that cause infections are bovine viral diarrhoea virus type 1 (BVDV-1), bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) and HoBi-like (BVDV-3). This work aimed to investigate the diversity of pestiviruses in bovine serum samples from the North of Brazil. For this, RT-PCR in the serum of 944 cattle was performed, followed by Sanger sequencing of the respective amplification products. In addition, the results were compared to serum neutralization conducted with 340 samples. For RT-PCR, sera were first analyzed in pools and then individually analyzed. RT-PCR detected 3 positive animals (0.31%), being identified by Sanger sequencing as belonging to the BVDV-1e (1) and BVDV-3 (2) species. As this work is still in progress, SN still does not have its final results. To date, 75 samples have been tested for the presence of antibody against the BVDV-2 strain, 42 (56.0%) of which were positive, while 33 (44.0) were negative. The next steps will be aimed at testing the other samples against BVDV-2, followed by BVDV-1 and BVDV-3. The data found so far contribute to a better understanding of the species circulating in the Northern Region of Brazil, reinforcing the need for revision of vaccines considering the species present in each region of the country.

Keywords: BVDV; Soronetralization; Cattle; Pestivirus; Antibody.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características básicas dos pestivírus	13
Figura 2: Análise filogenética e classificação de pestivírus com base na proteína N	14
Figura 3: Histopatologia de linfonodo mesentérico e Placa de Peyer no dia 5 pós-infecção após inoculação oral de cepa não citopática de BVDV-1	18
Figura 4: Formação de bezerra PI	19
Figura 5: Condição zoossanitária para febre aftosa e área considerada no estudo, 2015	22
Figura 6: A) Cultivo de células MDBK sem a presença do efeito citopático. B) Cultivo de células MDBK com a presença de efeito citopático	25
Figura 7: Análise filogenética de pestivírus com base nas sequências de nucleotídeos da região 5'UTR.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Classificação e caracterização	12
2.2. Epidemiologia	15
2.3. Patogenia e sinais clínicos	16
2.4. Diagnóstico	19
2.5. Controle e profilaxia	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Amostras	21
3.2. Isolamento de RNA, RT-qPCR e Análise Filogenética	23
3.3. Cultivo Celular e Soroneutralização (SN)	24
4. RESULTADOS	25
4.1. RT-qPCR e Análise Filogenética	25
4.2. Soroneutralização	26
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

O Brasil figura entre os países de maior importância no setor agropecuário. Tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, chegando a aproximadamente 215 milhões de cabeças (IBGE, 2019). Em 2019 assumiu a posição de maior exportador de carne bovina em termos de volume, com uma produção de 9,9 milhões de toneladas, sendo 21% destinados ao mercado externo (USDA, 2019). A infecção por BVDV é uma importante doença na bovinocultura, sendo responsável por perdas produtivas, reprodutivas e prejuízos econômicos (FLORES et al., 2005; HOUE, 1995). Dentre os principais impactos, estão a redução no ganho de peso e o aumento do tempo para abate e produção de leite (HOUE, 2003; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Sendo assim, estudos que garantam a sanidade do rebanho brasileiro se fazem essenciais para a segurança alimentar e econômica do país.

A infecção causada pelo *Pestivirus* tem distribuição mundial e é responsável por importantes perdas econômicas e, portanto, é um dos principais alvos de programas de controle (HOUE 2003, RIDPATH 2003). Descrita pela primeira vez no Brasil no final da década de 1960, tem sido sistematicamente identificada em diversas apresentações clínicas e epidemiológicas (BOTTON et al. 1998, CANAL et al. 1998, SILVEIRA et al. 2015, FLORES et al. 2018).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) caracteriza-se como um vírus esférico de 40-60 nm e envelopado, com aproximadamente 12,5 kb e RNA de cadeia única. É membro do gênero *Pestivirus* e pertencente à família *Flaviviridae* (TAUTZ et al., 2003; GUNN et al., 2005; UZAL et al., 2016). Recentemente foi realizada uma nova classificação das suas espécies, sendo conhecidas como: *Pestivirus A* ou vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1), *Pestivirus B* ou vírus da diarreia viral bovina 2 (BVDV-2) e *Pestivirus H* ou pestivírus HoBi-like (BVDV-3) (ICTV, 2018). Devido a sua grande variabilidade genética, os pestivírus também foram classificados em subtipos: O BVDV-1 apresenta até 21 subtipos (1a até 1u), o BVDV-2 até três (2a até 2c) e o BVDV-3, quatro (3a até 3d). No Brasil, já houve relatos de ambas espécies, onde o BVDV-1a aparenta ser o mais presente na região Sul (WEBER et al., 2014), e o BVDV-3 na região Nordeste (SILVEIRA et al., 2017). Para fins de padronização, este trabalho irá se referir à espécie “HoBi-like” como “BVDV-3”.

Em relação ao efeito de replicação em cultivo celular, os isolados de BVDV podem ser divididos nos biótipos citopáticos (cp) e não citopáticos (ncp)

(DONIS,1995). Os isolados ncp são mais frequentes e estão presentes nas infecções naturais. O BVDV cp se origina de mutações ou recombinações dos ncp, sendo responsável por gerar animais persistentemente infectados (PI) (FLORES, 2007). Os PIs resultam de uma infecção materna no período inicial da gestação (FULTON et al., 2009b), que é transmitida para o feto via transplacentária. Estes indivíduos caracterizam-se por um crescimento retardado e como portadores permanentes que excretam o vírus em suas secreções e excreções, considerado um dos principais responsáveis pela manutenção do vírus no rebanho (FLORES, 2017).

Além dos bovinos, os pestivírus também podem acometer outras espécies, como ovinos, caprinos, suínos e ruminantes selvagens (BECHER et al, 1997, VILCEK and NETTLETON, 2006). Os animais acometidos tendem a ser assintomáticos; no entanto, as manifestações clínicas podem variar desde sinais leves até doença aguda fatal. As consequências da infecção podem cursar com descargas nasal e ocular, doenças cutâneas, diarreia profusa hemorrágica e úlceras na boca (FLORES et al., 2005; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

O diagnóstico pode ser realizado através de testes moleculares, como a RT-PCR, a qual oferece praticidade quanto ao tempo para o resultado e o fornecimento de informações como a espécie e subtipo viral quando é realizada juntamente com o sequenciamento (PUHL, 2019, p. 14). Os testes sorológicos são mais indicados para levantamentos epidemiológicos, sendo o teste de soroneutralização (SN) o mais adotado. O controle da doença se dá pelo isolamento e eliminação de animais PI, podendo ou não ser associada ao uso de vacinas (BOLIN, 1995). A indicação de se realizar ou não a vacinação dos animais está relacionada com diversos fatores, como o tamanho do rebanho, rotatividade de animais na propriedade, além do histórico de doença clínica ou reprodutiva e confirmação da presença de BVDV (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012). No entanto, cabe destacar que no Brasil existem apenas vacinas contendo BVDV-1a e BVDV-2b, não correspondendo necessariamente com os subtipos presentes em todo o território nacional.

A infecção por BVDV é uma importante doença na bovinocultura, sendo responsável por perdas produtivas, reprodutivas e prejuízos econômicos (FLORES et al., 2005; HOUE, 1995). Dentre os principais impactos, estão a redução no ganho de peso e o aumento do tempo para abate e produção de leite (HOUE, 2003; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Levando em consideração o papel do Brasil no mercado internacional da bovinocultura, é fundamental que se atente para questões relacionadas com a sanidade

e manejo dos rebanhos comerciais. Para isso, deve-se ter estudos voltados principalmente para a epidemiologia da doença, com foco não apenas para a prevenção e controle do agente, mas também para as variantes virais específicas de cada região do país.

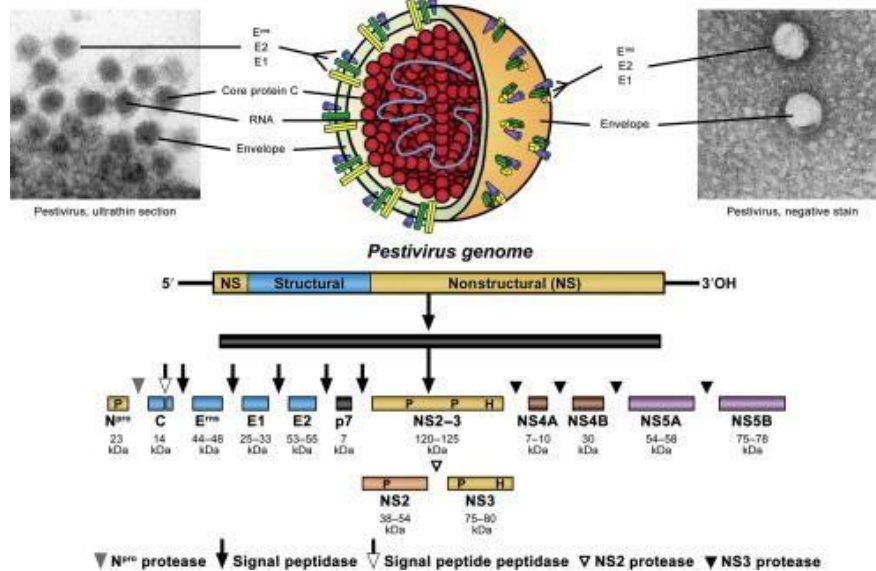
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Classificação e caracterização

A família *Flaviviridae* compreende diversos vírus de importância na saúde humana e animal, sendo eles divididos em quatro diferentes gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. Os componentes destes grupos possuem algumas características semelhantes e que indicam a sua derivação de um mesmo ancestral comum. Estes fatores indicativos estão relacionados com a estrutura e morfologia dos vírions, o tipo, a estrutura e organização do genoma e os aspectos básicos da expressão gênica e replicação viral.

Os pestivirus são caracterizados por um virion esférico de 40-60 nm, possuindo um nucleocapsídeo icosaédrico revestido externamente por um envelope proveniente da célula hospedeira (SIMMONDS et al., 2011). Tem seu genoma composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, de 12,3 a 12,5 kb. Sua molécula de RNA possui duas regiões não traduzidas que estão localizadas nas extremidades 5' e 3', além de uma única fase aberta para leitura (ORF). A ORF é traduzida na forma de uma poliproteína, a qual é clivada em 12 proteínas individuais: a autoprotease N terminal ou proteína N (Npro), proteína do capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (Erns, E1 e E2), proteína 7 (p7) e as proteínas não-estruturais (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Figura 1) (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SIMMONDS et al., 2011; NEILL, 2012).

Figura 1: Características básicas dos pestivírus. A figura mostra um diagrama de uma partícula de pestivírus com imagens de microscopia eletrônica ao seu lado. Abaixo, o genoma viral é mostrado em uma representação esquemática com a ORF codificando uma poliproteína indicada abaixo. A clivagem desta poliproteína gera novas proteínas virais mostradas. P, domínio de protease; H, helicases.

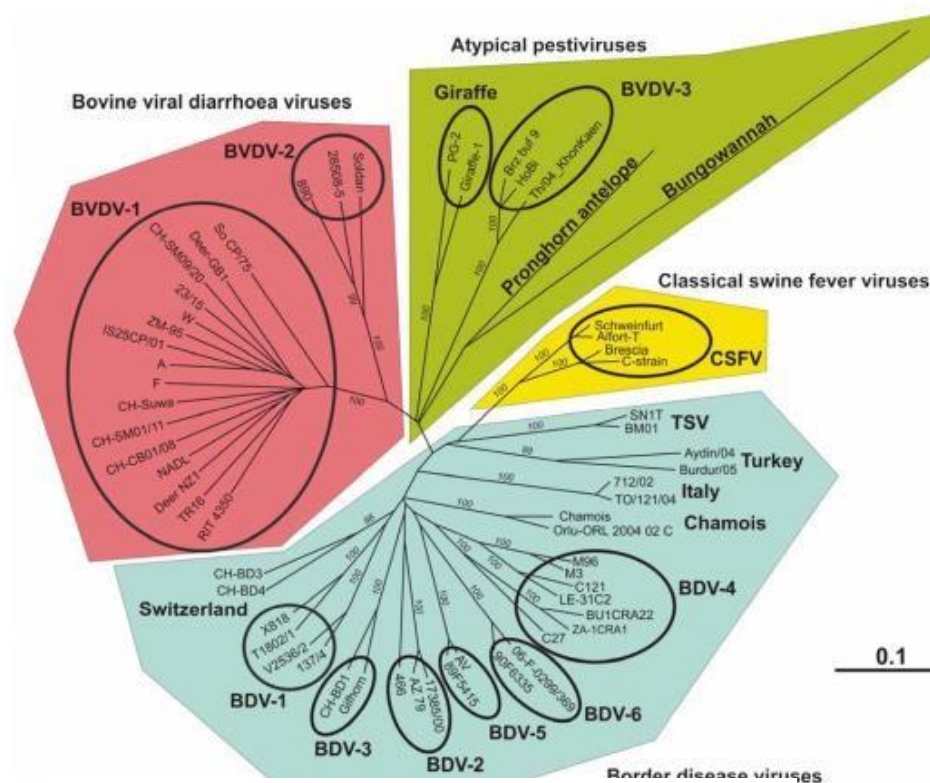


Fonte: Microscopia eletrônica: Harald Granzow e Frank Weiland, Instituto Friedrich-Loeffler; design gráfico: Mandy Jorn, Friedrich-Loeffler-Institut, extraído de TAUTZ, Norbert; TEWS, Birke Andrea; MEYERS, Gregor. *The Molecular Biology of Pestiviruses*. **Advances In Virus Research**, [s.l.], p.47-160, 2015. Elsevier.

Os pestivirus podem se apresentar com dois biótipos distintos: os vírus citopáticos (cp) e os não citopáticos (ncp). O biótipo ncp é o mais comumente encontrados a campo, e caracteriza-se pelas capacidades de replicação em células de cultivo celular sem causar destruição celular. Enquanto isso, os vírus cp tem origem por mutações, deleções e rearranjos genéticos a partir do biótipo ncp. Na prática, a principal diferença é que os vírus ncp podem produzir fetos Persistentemente Infectados (PI) caso sejam acometidos entre os dias 40 e 120 da gestação. No caso deste animal entrar em contato com uma amostra cp antigenicamente semelhante, pode vir a desenvolver a forma altamente fatal da infecção, conhecida como Doença das Mucosas (DM) (POCOCK et al., 1987).

O gênero *Pestivirus* era compreendido por quatro espécies oficialmente reconhecidas até 2017, conhecidas como: Vírus da Diarreia Viral Bovina 1 (BVDV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina 2 (BVDV-2), Vírus da Doença da Fronteira (BDV) e o Vírus da Peste Suína Clássica (CSFV). No entanto, em 2018, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) propôs uma nova nomenclatura, onde modifica a denominação de algumas espécies e adiciona oficialmente novas espécies já descritas ao gênero. Sendo assim, BVDV -1, BVDV2, CSFV e BDV passaram a ser Pestivirus A, B, C e D, respectivamente.

Figura 2: Análise filogenética e classificação de pestivírus com base na proteína N



Fonte: (SCHWEIZER, 2010)

Embora não seja reconhecido pela ICTV, as espécies podem ser divididas em diversos subgrupos. Com base em diversos estudos de filogenia, o Pestivirus A (BVDV-1), por exemplo, atualmente pode ser dividido em pelo menos 21 subtipos nomeados por ordem alfabética (“a” a “u”) (DENG et al., 2012). O Pestivirus B (BVDV-2) é dividido em três subtipos (“a” a “c”) (FLORES et al., 2002). Algumas das novas espécies incluídas no gênero também demonstram grande diversidade genética, como é o caso do Pestivirus H (‘HoBi’-like/BVDV-3), com quatro subtipos propostos (“a” a “d”) de acordo com a origem geográfica das cepas (MISHRA et al., 2014) (Figura 2).

Estas divisões em subgrupos dentro das espécies devem-se a grandes variações genéticas entre as cepas, e a maior implicação prática destas variações é que as mesmas podem gerar baixa reatividade sorológica cruzada, levando a falhas vacinais e perda da habilidade de detecção dos testes de diagnóstico (RIDPATH, 2003). Com o objetivo de simplificar a compreensão do texto, a partir desta etapa do trabalho, o Pestivirus A será chamado de BVDV-1, Pestivirus B, de BVDV-2 e Pestivirus H, de BVDV-3.

2.2. Epidemiologia

Segundo o ICTV, os *Pestivirus* podem acometer suínos e ruminantes, principalmente bovinos, ovinos e caprinos. Apesar de ser descrita frequentemente em animais domésticos, esta infecção também já foi relatada em diversas espécies silvestres (BECHER et al., 1999; VILCEK; NETTLETON, 2006; SEDLAK; GIRMA; HOLEJSOVSKY, 2009; VILCEK et al., 2010; FERNÁNDEZ-SIRERA et al., 2011; MARCO et al., 2011; GAO et al., 2013; GRANT et al., 2015; WOLFF et al., 2016).

O primeiro relato de BVDV ocorreu no ano de 1946, em um surto que acometeu bovinos nos Estados Unidos (EUA). Pesquisadores da Universidade de Cornell (Ithaca, Nova Iorque, EUA) foram os responsáveis pela primeira identificação do agente, o qual se caracterizava por provocar quadros de hipertermia, anorexia, gastroenterite severa e ulcerações nas mucosas oral e nasal (CHILDS, 1946; OLAFSON, MCCALLUM & FOX et al., 1946; BAKER, 1995). No Brasil, casos de BVDV são descritos desde o final dos anos 1960 (CORREA; NETO; BARROS, 1968); porém, o primeiro isolamento foi obtido apenas em 1974, a partir de um feto coletado de um matadouro (VIDOR, 1974). Relatos atuais apontam a ampla distribuição da infecção nos rebanhos brasileiros, com índices de soropositividade podendo variar entre 43 e 90% dos rebanhos (CANAL et al., 1998; POLETTO et al., 2004; THOMPSON et al., 2006; QUINCOZES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2013).

As espécies de BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3 são frequentemente relatados em ruminantes de rebanhos brasileiros (CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2000, 2002; STALDER et al., 2005; CORTEZ et al., 2006; BIANCHI et al., 2011; WEBER et al., 2013, 2016b; OTONEL et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015). O BVDV-1 é mais frequentemente encontrado a campo na América, Europa e Austrália. Apesar do BVDV-2 ter sido detectado em um primeiro momento como um

surto gastroentérico na América do Norte, este já se disseminou por diversos continentes (PELLERIN et al., 1994; BECHER et al. 2003; RIDPATH et al., 2010; MINAMI et al., 2011). Acredita-se que o mesmo já estivesse presente em diversas regiões, mas não era detectado ou classificado como BVDV-1. O BVDV-3 foi descrito pela primeira vez por pesquisadores europeus, em 2004, após detecção em amostras de Soro Fetal Bovino (SFB) oriundas do Brasil. Desta forma, infecções causadas pelas três espécies mencionadas acima são frequentemente relatadas em ruminantes de rebanhos brasileiros (CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2000, 2002; STALDER et al., 2005; CORTEZ et al., 2006; BIANCHI et al., 2011; WEBER et al., 2013, 2016b; OTONEL et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015).

Os bezerros PI apresentam significativa relevância epidemiológica, caracterizando-se como os principais reservatórios e fontes de disseminação do vírus (BAKER, 1995; HOUE, 1999; LINDBERG; ALENIUS, 1999). Estes indivíduos excretam o vírus de forma constante, em altos títulos em secreções (nasais, saliva, sêmen, leite) e em níveis menores em excreções (urina e fezes) (BROCK et al., 1998; LINDBERG; ALENIUS, 1999; ARENHART et al., 2009; BAUERMAN et al., 2014). Os animais infectados também podem excretar o vírus durante a fase aguda da doença, embora seja com títulos inferiores e durante 3 a 10 dias (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; RIDPATH; BAUERMAN; FLORES, 2012).

A transmissão do vírus pode ocorrer por contato direto (focinho-focinho, coito, mucosa-mucosa), indireto (focinho-secreções/excreções, focinho-feto abortado/placenta, contato com secreções/excreções). Pode haver transmissão através de sêmen e embrião contaminado, assim como por via iatrogênica, onde a infecção ocorre pelo contato com agulhas, material cirúrgico contaminado, luvas de palpação, tatuadores. O vírus normalmente é introduzido nos rebanhos a partir da inclusão de animais PI ou fêmeas gestando fetos PI, introdução de animais durante a fase aguda ou mais raramente através do contato entre animais de rebanhos vizinhos (FLORES, 2007).

2.3. Patogenia e sinais clínicos

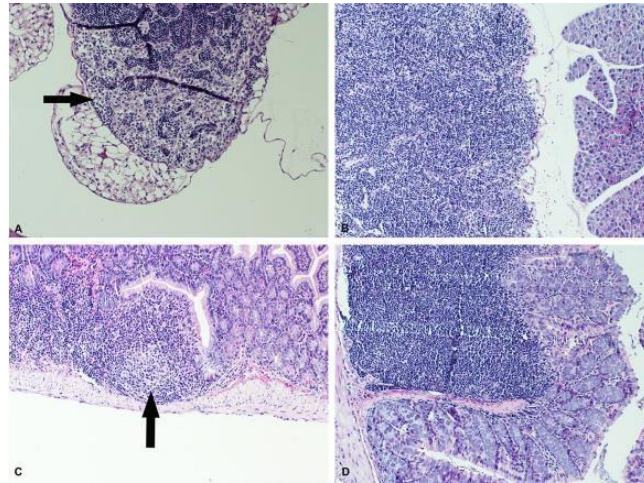
A infecção ocorre através da via oro-nasal, tendo os epitélios do trato respiratório superior, orofaringe e o tecido linfóide regional como sítios primários de replicação. A severidade da infecção aguda causada pelo BVDV pode variar de acordo

com diversos fatores, como a cepa viral, o *status* imunológico e reprodutivo do animal acometido, além da ocorrência de infecções secundárias. Sendo assim, a infecção provocada pelo pestivirus em bovinos pode ser classificada como Infecção aguda de animais não-prenhes e Infecção aguda de fêmeas prenhes (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012).

Na maioria dos casos, machos e fêmeas não prenhes imunocompetentes são assintomáticos durante a infecção (BAKER, 1995; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012). Em episódios causados por isolados de maior virulência, podem apresentar um curto período febril, associado por sialorreia, descarga nasal, tosse, diarreia, lesões ulcerativas na mucosa oral e lesões de pele (MOERMAN et al., 1994; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SANTOS et al., 2011; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012). É

importante destacar que por serem imunodepressores, os pestivirus podem predispor os animais acometidos a infecções provocadas por outros agentes patogênicos. O período de incubação do vírus pode variar entre três e setes dias, o qual é seguido por quadros de hipertermia transitória e leucopenia. Pode-se fazer a detecção do vírus no sangue entre quatro e seis dias após a infecção, em que a viremia é capaz de persistir por até 15 dias. O tecido linfóide, compreendido por tonsilas, tecido linfóide associado a mucosas, linfonodos e placas de Peyer são componentes de um importante sítio de replicação e alvo da patogenia viral (Figura 3). A enfermidade tende a ser autolimitante, estando associada com uma alta morbidade e mortalidade extremamente baixa ou nula (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012).

Figura 3: Histopatologia de linfonodo mesentérico e Placa de Peyer no dia 5 pós-infecção após inoculação oral de cepa não citopática de BVDV-1.

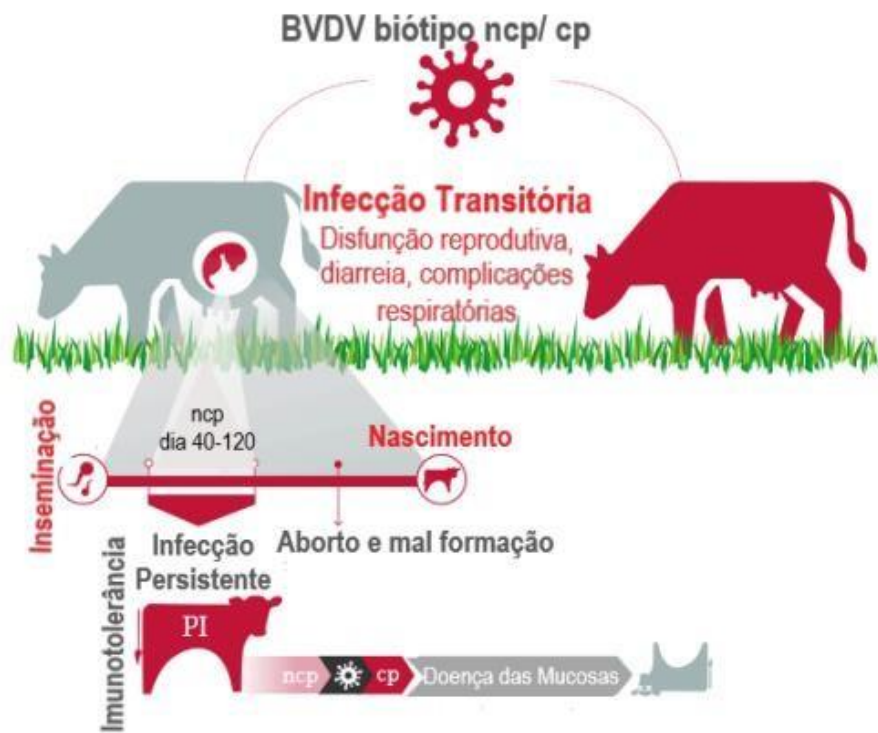


Fonte: Han, Y.-J., Kwon, Y.-J., Lee, K.-H., Choi, E.-J., & Choi, K.-S. (2016). Experimental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhea virus 1 in mice induces

A infecção de fêmeas prenhes pode provocar a transmissão vertical do vírus para o embrião ou feto. As consequências desta infecção estarão relacionadas ao biótipo (cp/ncp), amostra viral, bem como o estágio da gestação. Com isso, é possível que ocorram casos de reabsorção embrionária, abortos, mumificação fetal, natimortos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, ou nascimento de animais PI (Figura 4) (MCCLURKIN et al., 1984; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Episódios de abortos provocados pelo BVDV podem vir a ocorrer durante qualquer período da gestação, embora aconteça com maior frequência a partir dos 40 dias de gestação. Nestes casos, é comum que os fetos estejam autolizados e apresentem poucas lesões características. As malformações fetais são bastante frequentes em rebanhos acometidos pelo BVDV, e tende a ocorrer quando a infecção acontece entre os 100 e 150 dias de gestação. As principais alterações são encontradas no sistema nervoso central (hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, desmielinização e defeitos esqueléticos) e nos olhos (atrofia ou displasia da retina, catarata e microftalmia). Outros achados de menor ocorrência também podem ser observados, como aplasia tímica, braquignatismo, retardo de crescimento e artrogripose (FLORES, 2007).

Figura 4: Formação de bezerra PI



Fonte: Adaptada de Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, 2018

2.4. Diagnóstico

A maioria das cepas de pestivirus são de baixa virulência, e mesmo as mais virulentas não apresentam sintomas patognomônicos da doença; sendo assim o diagnóstico clínico é bastante complexo. Desta forma, deve-se suspeitar de infecções por BVDV sempre que houver sintomas reprodutivos (perdas embrionárias, abortos, malformações fetais, nascimentos de animais fracos ou morte perinatal). Outros sintomas entéricos e respiratórios, como componentes hemorrágicos, erosões e ulcerações do trato digestivos também podem ocorrer. Bezerros fracos, com crescimento retardado e predisposição a outras enfermidades devem ser considerados suspeitos de serem PI (BAKER, 1995; MURPHY et al., 1999; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

O teste de diagnóstico padrão é o isolamento em cultivos celulares, seguido pela identificação dos respectivos antígenos virais via imunofluorescência ou imunoperoxidase, devido ao fato de que a maioria das amostras são ncp.

Os métodos relacionados com a biologia molecular, como a RT-PCR e RT-qPCR, são úteis para fins de diagnóstico, tendo como vantagem a capacidade de detectar pequenas quantidades de vírus e partículas virais não integras (BRUM; WEIBLEN, 2012). Devido à sua alta conservação, têm-se adotado protocolos baseados na amplificação de fragmentos da região 5'UTR para a detecção de pestivírus (VILCEK et al., 1994; LETELLIER et al., 1999; BAXI et al., 2006; DECARO et al., 2012c).

A soroneutralização (SN) e ensaio imunoenzimático (ELISA) consistem nas principais técnicas de diagnóstico sorológico (OIE, 2008). Contudo a soropositividade de um animal indica apenas a exposição prévia ao agente. Animais infectados de forma aguda, irão soroconverter entre 10 a 14 dias após a exposição inicial, sendo a sorologia pareada uma boa alternativa de indicação da infecção ativa. É importante destacar que animais PI geralmente não apresentam anticorpos no soro, visto que não desenvolvem resposta imune ao vírus (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012). As técnicas de testes sorológicos são indicadas para utilização em levantamentos epidemiológicos e monitoria de rebanhos (LINDBERG; ALENIUS, 1999), contudo, podem ter seu valor limitado devido ao uso de vacinas (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012).

As glicoproteínas do envelope E2 e E^{RN}s e a proteína não estrutural NS2-3 são os principais antígenos virais relacionados com a resposta imune, e por esta razão são adotados para a realização de testes sorológicos. A E2 tem função de imunoproteção, bem como estimular a produção de anticorpos neutralizantes como resposta a infecção viral. Enquanto isso, a Erns e a proteína não estrutural NS2-3 participam da resposta imune (CORAPI; DONIS; DUBOVI, 1990; NEILL, 2012).

2.5. Controle e Profilaxia

O controle de BVDV pode se dar com ou sem a adoção de vacina, onde a escolha do método a se utilizar dependerá de fatores como histórico do rebanho, risco de introdução do agente e de outros fatores epidemiológicos (FLORES, 2012).

A não adoção da vacina é indicada para rebanhos fechados e sem o frequente ingresso de animais, como em casos de rebanhos extensivos de gado de corte e episódios em que o rebanho não apresenta sintomatologia sugestiva de infecção pelo BVDV. A fim de evitar a introdução do agente, é essencial que se adote medidas básicas de biossegurança, além de realizar a testagem dos animais para o vírus antes que os mesmos ingressem na propriedade. A principal forma de introdução da infecção se dá por meio de animais infectados. Desta forma, bezerros (com potencial de serem PI) e

vacas prenhes soropositivas (potencialmente geradoras de fetos PI) devem ser devidamente identificados e removidos do rebanho (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012).

O controle com vacinação é recomendado para propriedades de rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica ou reprodutiva e confirmação da presença de BVDV (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012). É indicada para a imunização de fêmeas suscetíveis antes da temporada de cobertura, a fim de prevenir a transmissão via transplacentária e a provável geração de animais PI (MOENNIG et al., 2005). Esta estratégia vem sendo bastante utilizada em países como os Estados Unidos e Canadá, principalmente quanto ao uso de vacina vivas modificadas (MLV) (NEWCOMER, 2015). Contudo, cabe ressaltar que para o sucesso deste tipo de protocolo, é fundamental a constante atualização das variantes virais circulantes, e que devem constar nas vacinas (MAHONY et al., 2005), devido às diferenças de imunidade cruzada entre diferentes espécies e subtipos de pestivírus (RIDPATH, 2016).

No Brasil, a maior parte das vacinas licenciadas são inativadas e contém cepas de BVDV-1a e BVDV-2a, não abrangendo os tipos mais recorrentes no País (de BRITO et al., 2010; Zardo et al., 2017; WEBER et al., 2014). Muitas destas se caracterizam por serem polivalentes, contendo antígenos de herpesvírus tipo 1, vírus respiratório sincicial bovino e vírus parainfluenza tipo 3 bovino. Este trabalho tem como objetivo investigar a diversidade de pestivírus de ruminantes em bovinos da Região Norte do Brasil (estados do PA, AM, RR, AP). Trabalhos realizados com vacinas disponibilizadas no Brasil têm demonstrado pouca eficiência frente a isolados presentes no país, além da constatação da produção de baixos títulos de anticorpos e ausência de proteção fetal (ZARDO, 2017; ANZILIERO et al., 2015). Desta forma, as vacinas utilizadas no Brasil necessitam ser revisadas, de forma que contenham as variantes em circulação no país, já descritas em trabalhos prévios (BIANCHI et al., 2011; WEBER et al., 2014a, 2014b; SILVEIRA et al., 2015).

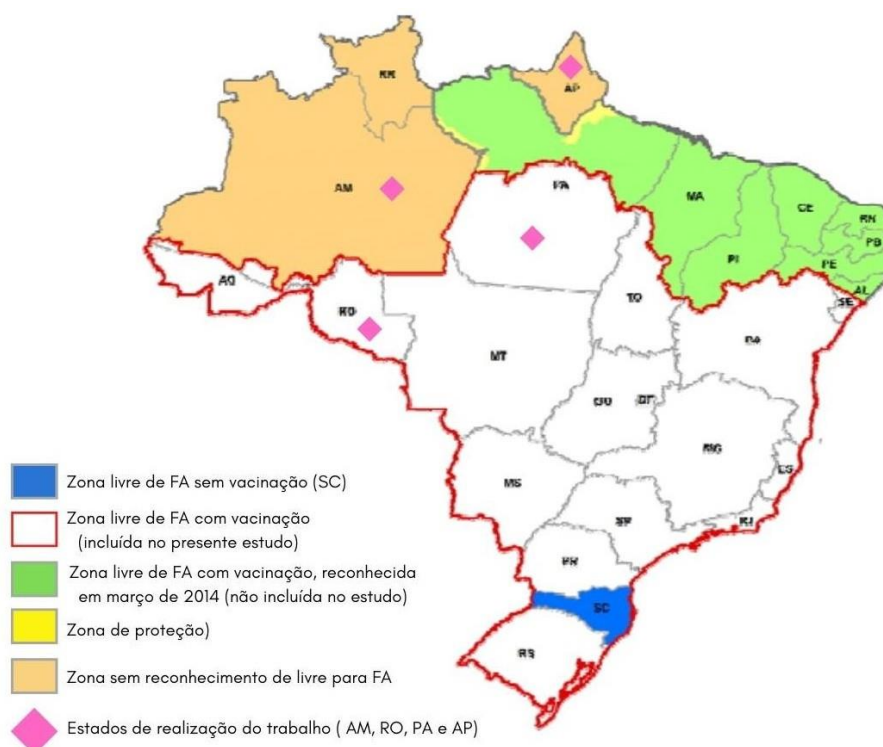
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras:

As amostras de soro bovino utilizadas neste trabalho foram coletadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em parceria com os Serviços Veterinários Estaduais (SVEs), para realização do inquérito epidemiológico

para o Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA), buscando atender compromissos de certificação sanitária firmados com países importadores de carne bovina. O estudo foi conduzido no ano de 2014, para a avaliação de circulação viral e de eficiência da vacinação para febre aftosa no Brasil (Figura 5).

Figura 5: Condição zoossanitária para febre aftosa e área considerada no estudo, Brasil, 2015



Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2015

A população alvo deste estudo foi constituída por rebanhos bovinos da zona livre com vacinação, entre 6 e 24 meses de idade. Trabalhos anteriores já relataram que bovinos com mais de 24 meses de idade apresentam perfil imunológico semelhante ao de bovinos entre 13 e 24 meses de idade, por esta razão o referido grupo etário não participou deste trabalho. No total, foram analisadas 944 amostras, sendo 536 delas provenientes de rebanhos do Estado do Amazonas (AM), 147 do Amapá (AP), 195 de Roraima (RR) e 66 do Pará (PA).

Alguns elementos podem influenciar diretamente no resultado de cobertura imunitária bovina (fiscalização, divulgação, orientação e incentivo aos produtores rurais), e são particulares de cada Unidade Federativa (UF), o estudo considerou então cada Estado como uma subpopulação. Os subgrupos foram divididos

conforme o tamanho dos rebanhos e sua respectiva faixa etária. Sendo assim, bovinos de 6 a 12 meses e de 13 a 24 meses, agrupados em rebanhos com menos de 50 bovinos ou com mais de 50 animais.

Os bovinos selecionados para a coleta foram escolhidos de forma aleatória pelo DSA/SDA/MAPA, com base nos dados disponibilizados pelos SVEs. Os dados foram organizados considerando os bovinos alocados em número de propriedades rurais, conciliando a representatividade geográfica e viabilidade operacional.

3.2 Isolamento de RNA, RT-qPCR e Análise Filogenética

A técnica de RT-PCR oferece alta sensibilidade e é uma ótima opção para analisar amostras biológicas que possam conter baixas quantidades de vírus, como amostras de *pool* de soro ou amostras de animais com infecção aguda (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006). O RNA total foi isolado usando o TRIzol LS Reagent® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando as enzimas *GoScript™ Reverse Transcriptase* e *RNasin® Ribonuclease Inhibitors* (Promega®)."

O total de 944 amostras foram agrupadas em 50 pools de 20 amostras. Os pools positivos na RT-qPCR (VetMax™- Gold BVDV PI Detection kit. Thermo Fisher Scientific) foram analisados novamente, de forma individual e com protocolo de PCR convencional. Para a realização da RT-PCR, foram utilizados *primers* já descritos na literatura, com o objetivo de amplificar fragmentos das regiões 5'NCR, N^{pro} e proteína E2 do genoma dos pestivírus (VILCEK, 1994; VILCEK, 2001; TAJIMA, 2001).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%, com 0,1 µg/mL de Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) e visualizados sob lâmpada ultravioleta. As amostras positivas foram encaminhadas para o sequenciamento genético por método de Sanger, utilizando um ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer com kit de sequenciamento do ciclo Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, CA, EUA). As análises filogenéticas se deram através dos softwares Genious (Biomatters Ltda) e MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

3.3 Cultivo celular e soroneutralização (SN)

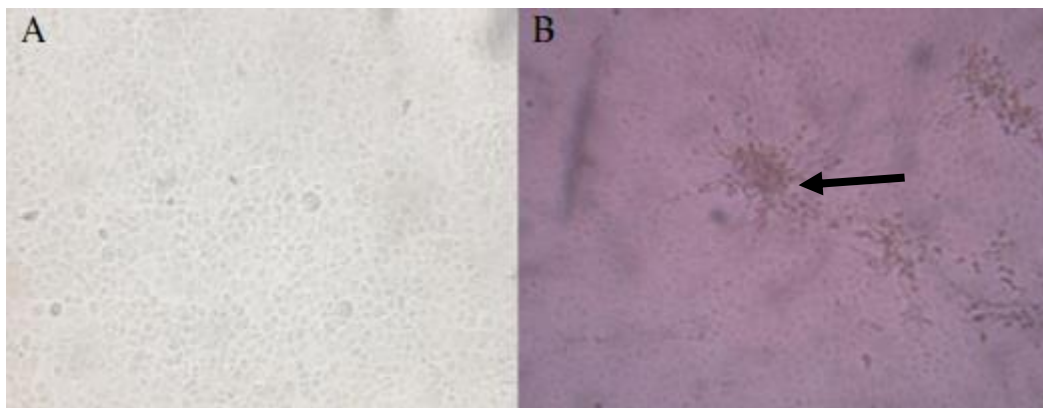
A SN é um teste sensível e específico, adequado para quantificação de anticorpos por titulação e é reconhecido como teste padrão ouro para sorologia de BVDV (OIE, 2008). Por ser um teste caro, trabalhoso e necessitar de rotina com cultivo celular, optou-se por realizar uma amostragem com 390 amostras de soro bovino, calculadas através da calculadora epidemiológica EpiTools (AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease) escolhidas de maneira aleatória sistemática. O cultivo viral se deu em células de linhagem de rim bovino MadinDarby (Madin Darby Bovine Kidney, MDBK). Células MDBK usadas durante o estudo foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), complementado com antibióticos em uma concentração final de 100 u/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e 5% de soro equino. As células MDBK foram previamente testadas livres para RNA de pestivírus por RT-PCR (WEBER et al., 2014).

Em um primeiro momento, os soros de teste foram inativados por calor, a 56°C, por 30 minutos. A partir de uma diluição inicial de 1:4, foram feitas diluições em triplicata em série do soro em placas de microtitulação de 96 poços, usando meio de cultura de células como diluente. Em cada diluição de soro, para cada amostra, um poço é deixado sem vírus para monitorar a evidência de toxicidade da amostra que poderia imitar a citopatologia viral ou interferir na replicação do vírus. Os soros para controle positivo e negativo também foram incluídos em cada teste. Foram utilizadas cepas de BVDV-1 (Oregon C24V), BVDV-2 (SV-253) e BVDV-3 (Italy HoBi-Like).

Os soros foram submetidos a diluições em série, partindo de 1:4 até 1:512. Foi inoculado um volume de 50µL de uma cepa de BVDV que continha 100 TCID⁵⁰ (50%) de dose infectante de cultura de tecido em cada poço. As placas foram levadas para a incubadora durante 1 hora à 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, 50 µL/poço de suspensão de células MDBK, contendo 10⁵ células/mL, foram adicionados em todos os poços. A placa foi levada novamente para a incubadora, onde ficou por 4-5 dias, em uma temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, tendo o efeito citopático (ECP) observado no final deste período. A visualização do efeito citopático nos poços foi realizada com o auxílio de microscopia ótica. O título de SN para cada soro é a diluição na qual o vírus é neutralizado em 50% dos poços. Um animal soronegativo não apresentará neutralização na diluição mais baixa (1:4), equivalente a uma diluição

final de 1:8 (OIE, *Terrestrial Manual*, 2018). Os ECP mais comuns são degeneração celular, vacuolização, agrupamento de células, células em “cachos de uva” (Figura 6).

Figura 6: (A) Cultivo de células MDBK sem a presença do efeito citopático. (B) Cultivo de células MDBK com a presença de efeito citopático



Fonte: Imagens cedidas por Letícia Baumbach

4. RESULTADOS

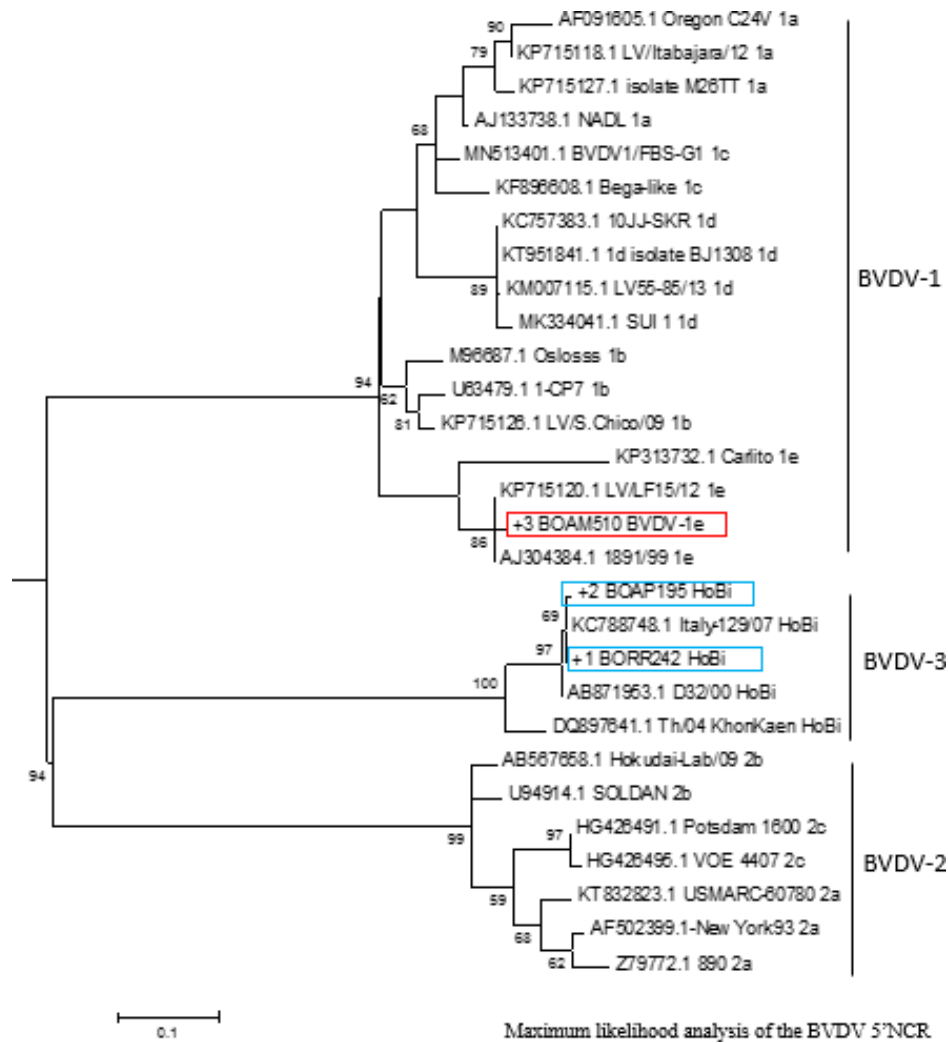
O presente trabalho faz parte do projeto de mestrado da co-orientadora do mesmo, o qual está em andamento. Sendo assim, apenas os resultados parciais serão apresentados neste momento, visto que nem todas as amostras processadas tiveram todas as etapas finalizadas.

4.1 RT-qPCR e Análise Filogenética

Após a realização dos testes de biologia molecular, foram detectadas três amostras positivas para pestivírus. Considerando um total de 944 amostras de soro bovino examinadas, o trabalho detectou uma frequência 0,31% de animais positivos. Este valor corrobora com os resultados encontrados em estudos semelhantes, realizados em diferentes regiões do Brasil, onde indicaram a frequência de 0,13% na região Nordeste (Silveira, 2017) e 0,36% no Estado do Rio Grande do Sul (Weber, 2014).

A análise filogenética detectou uma amostra BVDV-1e. Este subgenótipo foi relatado por estudo anterior pela primeira vez no Brasil, o qual descreveu o mesmo apenas no estado de Santa Catarina. As outras 2 amostras detectadas foram apontadas como BVDV-3 (Figura 7). Considerando fatores como a proximidade geográfica e sistemas de produção semelhantes, os resultados deste trabalho reforçam os já encontrados na região Nordeste, o qual também apresentou uma alta prevalência de BVDV-3 no seu rebanho.

Figura 7: Árvore Filogenética baseada na região 5'UTR



Fonte: Imagem cedida por Letícia Baumbach

4.2 Soroneutralização (SN)

A etapa de SN das amostras está em andamento e ainda não possui os resultados finais. Em um primeiro momento, as amostras estão sendo testadas contra a cepa de BVDV-2, sendo na sequência expostas às cepas de BVDV-1 e BVDV-3.

Os resultados parciais obtidos são relativos à testagem de 75 amostras, em que 42 (56,0%) delas foram positivas para a presença de anticorpos contra o BVDV-2, enquanto 33 (44,0%) delas não tiveram anticorpos neutralizantes detectados.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados até o presente momento neste trabalho complementam índices apontados por estudos realizados em outras regiões do Brasil. Sendo assim, nota-se que a prevalência desses pestivírus são distintas conforme a região analisada. Mesmo tendo o conhecimento de que este vírus está amplamente disseminado não apenas no território nacional, como também no mundo, ainda não temos maiores conhecimentos referentes à variabilidade genética das diferentes regiões. Considerando que o Brasil possui uma das maiores diversidades genéticas descritas no mundo, é fundamental que se entenda toda a variedade que se faz presente no país.

Este trabalho visa contribuir com dados referentes aos pestivírus circulantes na região Norte do Brasil. Podem ser empregados para a formulação de vacinas mais eficazes para rebanhos da região, que contenham as variantes virais circulantes. Os mesmos se fazem úteis para futuros programas regionais de controle e erradicação do vírus da diarreia viral bovina, bem como para o aprimoramento de métodos diagnósticos mais eficazes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. L.; MIRANDA, I. C. S.; HEIN, H. E.; NETO, W. S.; COSTA, E. F.; MARKS, F. S.; RODENBUSCH, C. R.; CANAL, C. W.; CORBELLINI, L. G. **Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil.** Research in Veterinary Science, v. 95, n. 3, p. 901–907, 2013.

ARENHART, S., BAUERMANN, F.V., OLIVEIRA, S.A.M., WEIBLEN, R., FLORES, E.F., 2009. **Excreção e transmissão do vírus da diarréia viral bovina por bezerros persistentemente infectados.** Pesqui. Veterinária Bras. 29, 736–742.

BAKER, J.C. **The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection.** Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 1995.

BAUERMANN FV, FALKENBERG, SM, VANDERLEY B et al (2014a) **Generation of calves persistently infected with HoBi-like pestivirus and comparison of methods for detection of these persistent infections.** J Clin Microbiol 52:3845–3852.

BAXI, M.; MCRAE, D.; BAXI, S.; GREISER-WILKE, I.; VILCEK, S.; AMOAKO, K.; DEREGT, D. A. **One-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses.** *Veterinary Microbiology*, v. 116, n. 1-3, p. 37–44, 2006.

BECHER, P., M. ORLICH, A.D. SHANNON, G. HORNER, M. Ko, 1997: **Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants.** *J. Gen. Virol.* 78, 1357-1366. Vilcek S, Nettleton PF. Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol.* 2006;116:1–12.

BECHER, P., ORLICH, M., KOSMIDOU, A., KONIG, M., BAROTH, M., THIEL, HJ. **Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification.** *Virology*, 1999.

BEER, M.; WERNIKE, K.; DRÄGER, C.; HÖPER, D.; POHLMANN, A.; BERGERMANN, C.; SCHRÖDER, C.; KLINKHAMMER, S. BLOME, S.; HOFFMANN, B. **High Prevalence of Highly Variable Atypical Porcine Pestiviruses Found in Germany.** *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016.

BIANCHI, E.; MARTINS, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. **Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010).** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2011.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. **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.** *American Journal of Veterinary Research*, United States, 1995

BOTTON, S. A.; SILVA, A. M.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. **Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross neutralization.** *Brazilian Journal Medical Biological Research*, Brazil, 1998.

BROCK, K.V., GROOMS, D.L., RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R., 1998. **Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.** *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 22–26.

BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. **Deteção, identificação e quantificação de vírus.** In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia Veterinária - Virologia geral e doenças víricas*. 2nd. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 53–82.

CANAL, C. W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. **Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil.** *Veterinary Microbiology*, Netherlands, 1998.

CHILDS, T. X. **Disease in cattle** - Saskatchewan. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Canada, 1946.

CORAPI, W. V.; DONIS, R. O.; DUBOVI, E. J. **Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections.** Journal of Virology, United States, 1988.

CORREA, W. M.; NETTO, Z. C.; BARROS, H. M. **Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo.** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 1968.

de BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. **Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil.** Revista de Patologia Tropical, 2010.

DECARO, N.; SCIARRETTA, R.; LUCENTE, M. S.; MARI, V.; AMORISCO, F.; COLAIANNI, M. L.; CORDIOLI, P.; PARISI, A.; LELLI, R.; BUONAVOGLIA, C. **A nested PCR approach for unambiguous typing of pestiviruses infecting cattle.** Molecular and Cellular Probes, v. 26, n. 1, p. 42–46, 2012c.

DENG, Y.; SUN, C. Q.; CAO, S. J.; LIN, T.; YUAN, S. S.; ZHANG, H. B.; ZHAI, S. L.; HUANG, L.; SHAN, T. L.; ZHENG, H.; WEN, X. T.; TONG, G. Z. **High prevalence of bovine viral diarrhea virus 1 in Chinese swine herds.** Veterinary Microbiology, 2012.

DONIS, R. O. **Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host.** The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. United States, 1995.

FERNÁNDEZ-SIRERA, L.; CABEZÓN, O.; DEMATTEIS, A.; ROSSI, L.; MENEGUZZ, P. G.; GENNERO, M. S.; ALLEPUZZ, A.; ROSELL, R.; LAVÍN, S.; MARCO, I. **Survey of Pestivirus infection in wild and domestic ungulates from south-western Italian Alps.** European Journal of Wildlife Research, v. 58, n. 2, p. 425–431, 2011.

FLORES E.F., CARGNELUTTI J.F., MONTEIRO F.L., BAUERMAN F.V., RIDPATH J.F. & WEIBLEN R. 2018. **A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil** (1998- 373 Pesq. Vet. Bras. 40(5):368-373, May 2020 Identification and characterization of pestiviruses isolated from individual fetal bovine serum samples originated in Rio Grande do Sul state, Brazil. 2018). Anim. Health Res. Rev. 19(2):134-141

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

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S.; GIL, L. H. **Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2.** Virus Research, 2002.

FULTON, R.W., HESSMAN, B.E., RIDPATH, J.F., JOHNSON, B.J., BURGE, L.J., KAPIL, S., BRAZIEL, B., KAUTZ, K., RECK, A. **Multiple diagnostic tests to**

identify cattle with bovine viral diarrhoea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2009b.

GAO, S.; LUO, J.; DU, J.; LANG, Y.; CONG, G.; SHAO, J.; LIN, T.; ZHAO, F.; BELÁK, S.; LIU, L.; CHANG, H.; YIN, H. **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.

GIVENS, M. D.; NEWCOMER, B. W. **Perspective on BVDV control programs.** *Animal Health Research Reviews*, 2015.

GRANT, D. M.; DAGLEISH, M. P.; BACHOFEN, C.; BOAG, B.; DEANE, D.; PERCIVAL, A.; ZADOKS, R. N.; RUSSELL, G. C. **Assessment of the rabbit as a wildlife reservoir of bovine viral diarrhoea virus: Serological analysis and generation of transplacentally infected offspring.** *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1000, 2015.

GUNN GJ, SATTKAMP HW, HUMPHRY RW, STOTT AW. **Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus.** *Prev. Vet. Med.* 2005; 72:149–162.

HAN, Y.-J., KWON, Y.-J., LEE, K.-H., CHOI, E.-J., & CHOI, K.-S. **Experimental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus 1 in mice induces,** 2016.

HOUE H., LINDBERG A. & MOENNIG V. 2006. **Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe.** *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:427-436. 2006.

HOUE, H. **Economic impact of BVDV infection in dairies.** *Biologicals*, 2003

HOUE, H. **Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus.** *Veterinary Clinics of North America*, 1995.

KAWANISHI, N.; TSUDUKU, S.; SHIMIZU, H.; OHTANI, Y.; KAMEYAMA, K.; YAMAKAWA, M.; TSUTSUI, T.; MATSUURA, K.; OHASHI, S.; ISOBE, T.; YAMADA, S. **First isolation of border disease virus in Japan is from a pig farm with no ruminants.** *Veterinary Microbiology*, 2014.

KHODAKARAM-TAFTI, G. H. FARJANIKISH. **Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds.** *Iranian Journal of Veterinary Research.* 18 (2017), pp. 154–163.

LETELLIER, C.; KERKHOF, P.; WELLEMANS, G.; VANOPDENBOSCH, E. **Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region.** *Veterinary Microbiology*, v. 64, p. 155–167, 1999.

LINDBERG, A. L.; ALENUS S. **Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations.** *Veterinary Microbiology*, 1999.

- MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. **Flaviviridae**. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. *Fenner's Veterinary Virology*. 4. ed. London: Academic Press, 2011.
- MAHONY, T.J., MCCARTHY, F.M., GRAVEL, J.L., CORNEY, B., YOUNG, P.L., VILCEK, S., 2005. **Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia**. *Vet. Microbiol.* 106, 1–6.
- MARCO, I.; CABEZÓN, O.; ROSELL, R.; FERNÁNDEZ-SIRERA, L.; ALLEPUZ, A.; LAVÍN, S. **Retrospective study of pestivirus infection in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and other ungulates in the Pyrenees (NE Spain)**. *Veterinary Microbiology*, v. 149, p. 17–22, 2011.
- McCLURKIN, A.W., BOLIN, S.R., CORIA, M.F. **Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1985.
- MISHRA, N.; RAJUKUMAR, K.; PATERIYA, A.; KUMAR, M.; DUBEY, P.; BEHERA, S. P.; VERMA, A.; BHARDWAJ, P.; KULKARNI, D. D.; VIJAYKRISHNA, D.; REDDY, N. D. **Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India**. *Veterinary Microbiology*, 2014.
- MOENNIG, V.; EICKEN, K.; FLEBBE U.; FREY, H. R.; GRUMMER, B.; HAAS, L.; GREISER-WILKE, I.; LIESS, B. **Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD)**. *Preventive Veterinary Medicine*, 2005.
- MOERMAN, A.; STRAVER, P.J.; JONG, M.C.M.; de QUAK, J. **Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study**. *Central Diergeneeskundig Inst. DLO, Lelystad (Netherlands)*, 1994.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Herpesviridae**. *Veterinary Virology*. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1999.
- NEILL, J.D., 2012. **Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus**. *Biologicals* 41, 2–7.
- OIE. *Terrestrial Animal Health Code – World Organization for Animal Health. Bovine Viral Diarrhoea*, 2018
- OLAFSON P, MacCALLUM AD, FOX FH. **An apparently new transmissible disease of cattle**. *Cornell Vet.* 1946 Jul;36:205-13. PMID: 20995890
- OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A. F.; DEZEN, S.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S. a; ALFIERI, A. a. **The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil**. *Tropical Animal Health and Production*, v. 46, p. 87–92, 2014.
- PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. **Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities**. *Virology, United States*, 1994/ RIDPATH, J. F. *Bovine viral*

diarrheavirus: global status. *The Veterinary clinics of North America: Food animal practice*, 2010.

PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H.; M. **Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction.** *Veterinary Research*, 2010. IZER, 2010.

POCOCK, D. H., HOWARD, C. J., CLARKE, M. C.; BROWNLIE, J. **Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus.** *Archives of Virology*, 1987.

POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. **Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS.** *Ciência Rural*, v. 34, n. 2, p. 26–29, 2004.

POSTEL, A.; SCHMEISER, S.; PERERA, C. L.; RODRÍGUEZ, L. J.; FRIASLEPOUREAU, M. T.; BECHER, P. **Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1.** *Veterinary Microbiology*, 2013.

PUHL, Daniela Eliete. **Sorologia Comparativa para Pestivirus de Ruminantes em Rebanhos Bovinos do Nordeste Brasileiro.** 2019. 44 p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. D. O.; VARGAS, G. D. A.; VIDOR, T.; BROD, C. S. **Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul; Prevalence and factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in South of Rio Grande do Sul.** *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 2, p. 269–276, 2007.

RIDPATH, J. F. **BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control.** *Biologicals*, London, 2003.

RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, F. V.; FLORES, E. F. **Flaviviridae.** In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária - Virologia geral e doenças víricas.** 2nd. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 657–690.

RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, F. V.; FLORES, E. E. **Flaviviridae.** In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária- Virologia Geral e Doenças Víricas.** 3ed. ed. Santa Maria: [s.n.]. p. 677–708.

SEDLAK, K.; GIRMA, T.; HOLEJSOVSKY, J. **Pestivirus infections in cervids from the Czech Republic.** *Veterinari Medicina*, v. 54, n. 4, p. 191–193, 2009.

SILVEIRA, S.; BAUMBACH, L. F.; WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; da SILVA, M. S.; CIBULSKI, S. P.; BORBA, M. R.; MAIA, R. D.; COIMBRA, V. C. S.; de MORAES G. M.; RIDPATH, J. F.; CANAL, C. W. **HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil.** *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018.

SILVEIRA S.; WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; da SILVA, M. S.; STRECK, A. F.; PESCADOR, C. A.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; RIDPATH, J. F.; CANAL, C. W. **Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014.** *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017.

SILVEIRA, S.; WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; DA SILVA, M. S.; STRECK, A. F.; PESCADOR, C. A.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; RIDPATH, J. F.; CANAL, C. W. **Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014.** *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; COLLET, M. S.; GOULD, E. A.; HEINZ, F. X.; MEYERS, G.; MONATH, T.; PLETNEV, A.; RICE, C. M.; STIANSNY, K.; THIEL, H. J.; WEINER, A.; BUKHET, J. **Flaviviridae.** In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Ed.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2011. p. 1003–1020.

STALDER, H.P., MEIER, P., PFAFFEN, G., CANAL, C.W., RUFENACHT, J., SCHALLER, P., BACHOFEN, C., MARTI, S., VOGT, H.R., PETERHANS, E., 2005. **Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland.** *Prev. Vet. Med.* 72, 37–41.

TAJIMA, M. et al. **Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany.** *Virus research*, v. 76, n. 1, p. 31–42, jul. 2001.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D et al. **MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. 2013.

TAUTZ, N; TEWS, B.A.; MEYERS, G. **The Molecular Biology of Pestiviruses.** *Advances In Virus Research*, [s.l.], p.47-160, 2015. Elsevier.

TAUTZ N, THIEL HJ. **Cytopathogenicity of Pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhoea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication.** *Arch. Virol.* 2003; 148:1405–1412.

THOMPSON, A. J.; LEITE, R. M.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; PRADO, P. E. F.; LOBATO, A. I. P.; BRITO, C. P. T.; LAGE, A. P. **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, p. 290–301, 2006.

UZAL, FA, PLATTNER, BL, HOSTETTER, JM. **Alimentary system in pathology of domestic animals.** In: Maxie, MG, editor. *Jubb, Keneddy and Palmers pathology of domestic animals*. 6th Edn. St. Louis, Missouri: Academic Press Inc; 2016. pp. 122–130.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias**, v. especial, p.51-58, 1974).

VILCEK, S., HERRING, A.J., HERRING, J.A., NETTLETON, P.F., LOWINGS, J.P., PATON, D.J., 1994. **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.

VILCEK, S.; WILLOUGHBY, K.; NETTLETON, P.; BECHER, P. **Complete genomic sequence of a border disease virus isolated from Pyrenean chamois.** Virus Research, v. 152, n. 1-2, p. 164–8, 2010.

VILCEK, S., PATON, D.J., DURKOVIC, B., STROINVY, L., IBATA, G., MOUSSA, A., LOITSCH, A., ROSS-MANITH, W., VEGA, S., SCICLUNA, M.T., PAIFI, V., 2001. **Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups.** Arch. Virol. 146,99–115.

WOLFF, P. L.; SCHROEDER, C.; MCADOO, C.; COX, M.; NELSON, D. D.; EVERMANN, J. F.; RIDPATH, J. F. **Evidence of bovine viral diarrhoea virus infection in three species of sympatric wild ungulates in Nevada: life history strategies may maintain endemic infections in wild populations.** Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 792, 2016.

WEBER, M.N. *et al.* **Análises da epidemiologia molecular e evolução de pestivírus.** 125p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

WEBER, M. N., S. SILVEIRA, G. MACHADO, F. H. S. GROFF, A. C. S. MOSENA, R. F. BUDASZEWSKI, P. M. DUPONT, L. G. CORBELLINI, C. W. CANAL. **High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil.** Virus Research, 2014.

WEBER, M.N.; GALUPPO, A.G.; BUDASZEWSKI, R.F.; CORBELLINI, A.O.; MÓSENA, A.C.S.; PINTO, L.D.; MARQUES, L.S.; RODRIGUES, J. L.; CANAL, C.W. **Evaluation of pre-nucleic acid extraction for increasing sensitivity of detection of virus in bovine follicular fluid pools.** Theriogenology, 2013.