

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LUANA MARCHI QUADROS

**ASPECTOS CLÍNICOS E VIROLÓGICOS DA INFECÇÃO DE BEZERROS POR
UM ISOLADO BRASILEIRO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA**

Uruguiana

2015

LUANA MARCHI QUADROS

**ASPECTOS CLÍNICOS E VIROLÓGICOS DA INFECÇÃO DE
BEZERROS POR UM ISOLADO BRASILEIRO DO VÍRUS DA
DIARREIA VIRAL BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Mário Celso Sperotto Brum

Uruguaiiana

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

Q926a Quadros, Luana Marchi

Aspectos clínicos e virológicos da infecção de bezerros por um isolado brasileiro do vírus da diarreia viral bovina / Luana Marchi Quadros.
39 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2015.

"Orientação: Mário Celso Sperotto Brum".

1. bovino. 2. BVDV. 3. infecção experimental. 4. vírus . 5. caracterização de infecção. I. Título.

LUANA MARCHI QUADROS

**ASPECTOS CLÍNICOS E VIROLÓGICOS DA INFECÇÃO DE
BEZERROS POR UM ISOLADO BRASILEIRO DO VÍRUS DA
DIARREIA VIRAL BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Dissertação defendida e aprovada em 16 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum
Orientador
Curso de Medicina Veterinária – UNIPAMPA

Profa. Dra. Carolina Kist Traesel
Curso de Medicina Veterinária – UNIPAMPA

Profa. Dra. Sônia de Ávila Botton
Curso de Medicina Veterinária – UFSM

AGRADECIMENTOS

Não caminhamos sozinhos na nossa trajetória, acho que isto resume um pouco do que foi meu mestrado, este trabalho é de todas as pessoas que me deram estímulo, força, norteio e positividade. O laboratório de virologia formou-se como uma pequena família nestes dois anos, tentamos dar o melhor de nós, independente da fase que estávamos passando. Alcançamos muitas liberdades (cafés, bolos, picadinhos no laboratório...), metas (sem contaminação!), novas logísticas na rotina (quadro branco de tarefas diárias, bloquinhos amarelos, canetinhas coloridas, folhas de rascunho e jalecos personalizados), reforçamos nossos vínculos, mesmo havendo várias diferenças entre todos. Nem tudo foi perfeito, mas dentro das nossas possibilidades, esforços e circunstâncias conseguimos nosso melhor.

Obrigada aos meus “combustíveis” que tanto me deram força: minha fé, minha família e ao meu namorado Rui Dorneles.

Ao meu orientador Professor Mário Celso Sperotto Brum, muito obrigado pela oportunidade, confiança e orientação. Durante esse tempo tentei cuidar do laboratório e realizar as técnicas com todo esforço e carinho...

Aos “Virotech’s”! José Conrado Jardim, Ingrid Merchioratto, Laís Miranda e Ignácio Nunes, Obrigado pelo auxílio e companheirismo! Não deixem de seguir o protocolo.

Ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infectocontagiosas da Unipampa, pelo auxílio nas esterilizações dos materiais, em especial a minha amiga Taiane Escobar por todo auxílio e força que me deu durante esses dois anos.

Ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria pela disponibilização de células e amostras virais.

A profa. Francieli W. S. Cibir, Laboratório Biotech da Unipampa pelo auxílio com as avaliações hematológicas.

Ao professor Claudio W. Canal, Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo sequenciamento do vírus.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 486302/2013-0 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) ARD 010-0222-0 pelo auxílio financeiro.

“O futuro, como o imagina?
O futuro é uma espécie de banco,
ao qual vamos remetendo, um por um,
os cheques das nossas esperanças,
Ora! Não é possível que todos
os cheques sejam sem fundos...”

Mário Quintana

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é considerado um importante patógeno de bovinos e está amplamente disseminado no rebanho brasileiro. A transmissão do vírus ocorre por contato direto e indireto entre animais infectados e animais susceptíveis, sendo que os animais persistentemente infectados são fundamentais na manutenção do vírus no rebanho. A reprodução experimental da infecção possibilita o estudo dos parâmetros clínicos e virais, bem como o estabelecimento de parâmetros para testes de diagnóstico, de vacinas e a determinação de medidas de controle. Com o objetivo de estudar a patogenicidade de uma amostra brasileira de BVDV-1a 241.10, quatro bovinos foram inoculados pela via intranasal com uma suspensão viral contendo $10^{7.2}$ TCID₅₀/ml. Um animal não inoculado foi mantido em contato para avaliar a transmissibilidade. Após a inoculação, os animais foram monitorados diariamente para observação de sinais clínicos. Amostras de secreções nasais foram coletadas nos dias -3 ao 15 dias pós-inoculação (pi) e sangue nos dias -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 pi para detecção da presença viral por isolamento em cultivo celular. A contagem dos leucócitos totais foi realizada em diferentes momentos nos dias -3, 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pi. A detecção de anticorpos foi realizada no soro em intervalos de 7 dias até o dia 42 pi. Após a inoculação não foram observados sinais clínicos evidentes, apenas secreção nasal e ocular serosa entre os dias 1 e 5 pi e tosse discreta entre os dias 2 e 4 pi. A temperatura corporal teve um leve aumento entre os dias 4 e 6 pi. O animal controle não desenvolveu nenhum dos sinais observados no grupo infectado. A detecção viral no sangue revelou a presença de viremia entre os dias 4 e 8 pi e nas secreções nasais entre os dias 1 até 10 pi. O vírus não foi isolado no sangue e secreção nasal do animal contato, demonstrando ausência da transmissão. Nos animais inoculados observou-se uma redução na contagem total de leucócitos entre os dias 3 e 12 dpi. Anticorpos neutralizantes foram detectados inicialmente no dia 14 pi em todos os animais inoculados e permaneceram até o dia 42 pi. A detecção de anticorpos anti-p80 não-estrutural ocorreu em dois animais no dia 14 pi e no dia 42 pi todos os animais soroconverteram. O animal controle não desenvolveu anticorpos em nenhum momento. Assim sendo, conclui-se que a amostra de BVDV utilizada na infecção experimental possui baixa patogenicidade e reduzida capacidade de transmissibilidade para os animais em contato. Desta forma, a disseminação da infecção pode ocorrer na população bovina de forma discreta e de difícil percepção.

Palavras-chaves: Inoculação Experimental. Vírus. Bovinos. Transmissão. Pestivírus.

ABSTRACT

The bovine viral diarrhea virus (BVDV) is considered an important pathogen of cattle and are widespread in the Brazilian herd. Transmission of the virus occurs by direct and indirect contact between infected and susceptible animals, and the persistently infected animals are essential in the maintenance of virus in the herd. The experimental reproduction of infection allows the study of clinical and viral parameters as well as setting parameters for diagnostic testing of vaccines and the determination of control measures. In order to study the pathogenicity of a sample of Brazilian BVDV-1a 241.10 four cattle were inoculated intranasally with a viral suspension containing $10^{7.2}$ TCID₅₀ / ml. One non-inoculated cattle was kept in contact with the inoculated cattle to assess the transmissibility. After inoculation, the animals were monitored daily to observe clinical signs. Samples of nasal secretions were collected on days -3 to 15 post-inoculation (pi) and blood on days -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 pi for detection of viral presence by isolation in cell culture. The total leukocyte count was performed at different moments on days -3, 0, 3, 6, 9, 12, and 15 pi. The detection of antibodies was performed in serum at 7 day intervals until the 42 day post-inoculation. After inoculation no clinical signs were observed, only nasal and ocular serous secretion between days 1 and 5 pi and discreet cough between day 2 and 4 pi. Body temperature increased slightly between day 4 and 6 pi. Animal Control did not develop any of the signs observed in the infected group. The viral detection in the blood showed the presence of viremia between 4 and 8 days pi and nasal secretions between day 1 up to 10 pi. Virus was not isolated in the blood and nasal secretions of the animal contact, demonstrating the absence of transmission. In animals inoculated it was observed there was a reduction in total leukocyte count between day 3 up to 12 dpi. Neutralizing antibodies initially were detected on day 14 pi in all inoculated animals and remained until day 42 post-inoculation. The detection of anti-p80 antibodies occurred in two animals on day 14 post-inoculation and on day 42 post-inoculation all animals seroconverted. Animal Control did not develop antibodies at any moment. Therefore, it is concluded that the BVDV sample used for infection has low pathogenicity and reduced capacity of transmissibility for animal contact. Thus, the spread of infection can occur in the cattle population in a discreetly way and difficult perception.

Keywords: Experimental inoculation. Virus. Cattle. Transmission. Pestivirus.

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR	– região 3' não traduzida
5' UTR	– região 5' não traduzida
BDV	– vírus da doença da fronteira
BVDV	– vírus da diarreia viral bovina
BVDV-1	– vírus da diarreia viral bovina tipo 1
BVDV-2	– vírus da diarreia viral bovina tipo 2
BVDV-3	– vírus da diarreia viral bovina tipo 3
CP	– citopático
CSFV	– vírus da peste suína clássica
DM	– Doença das Mucosas
dpi	– dia pós inoculação
E1	– glicoproteína E1
E2	– glicoproteína E2
ELISA	– ensaio imunoenzimático
E ^{ms}	– glicoproteína Erns
GMT	– título médio geométrico
IFI	– imunofluorescência indireta
Kb	– quilobase
MDBK	– Madin-Darby bovine kidney
MEM	– Meio essencial mínimo
n.	– número
NCP	– não citopático
nm	– nanômetro
N ^{pro}	– protease amino terminal
ORF	– fase aberta de leitura
PCR	– reação em cadeia da polimerase
PI	– persistentemente infectado
pi	– pós inoculação
RNA	– ácido ribonucléico
SN	– soroneutralização
TCID ₅₀	– dose infectante para 50% dos cultivos celulares
UTR	– região não traduzida

LISTA DE SIGLAS

CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBEA	– Colégio de Ética no Uso de Animais
EUA	– Estados Unidos da América
FAPERGS	– Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
PPGCA	– Programa de Pós Graduação em Ciência Animal
UFSM	– Universidade Federal de Santa Maria
UNIPAMPA	– Universidade Federal do Pampa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	CAPÍTULO 1 - ASPECTOS CLÍNICOS E VIROLÓGICOS DA INFECÇÃO DE BEZERROS POR UM ISOLADO BRASILEIRO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA TIPO 1A.....	16
2.1	RESUMO.....	17
2.2	ABSTRACT.....	18
2.3	INTRODUÇÃO.....	18
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.5	RESULTADOS	21
2.6	DISCUSSÃO	23
2.7	CONCLUSÃO	25
2.8	REFERÊNCIAS.....	26
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXOS.....	36

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno de bovinos com distribuição mundial (BAKER, 1995). No Brasil, onde a produção bovina é expressiva, a infecção encontra-se disseminada em todo o país e causa prejuízos consideráveis (BOTTON et al., 1998; CANAL et al., 1998; FLORES, 2005; OLIVEIRA et al., 1996). Este agente pode produzir perdas econômicas de diversas maneiras, sendo indiretamente consequência do descarte de animais ou imunossupressão, ou diretamente devido a redução da produção, baixas taxas de reprodução, distúrbios respiratórios e mortalidade, entre outras manifestações (HOUE, 2003). Nas últimas décadas a compreensão dos aspectos do agente, da epidemiologia, da patologia e das técnicas de diagnóstico e formas de controle têm sido objeto de diversos estudos.

O BVDV é um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, juntamente com o vírus da Peste Suína Clássica (CSFV) e o vírus da Doença da Fronteira (BDV), que infecta ovinos (HORZINEK, 1991). O BVDV é um vírus pequeno, de aproximadamente 40-60 nm de diâmetro, que contém um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope lipoprotéico (HORZINEK, 1991). O genoma é composto de uma molécula de RNA, polaridade positiva e 12,5 Kb de extensão (DONIS, 1995). Este genoma possui uma única ORF (*open reading frame*), que codifica uma poliproteína com 3988 aminoácidos e origina 12 proteínas. As extremidades da região codificadora são flanqueadas por duas regiões não codificantes que denominam-se de 5'UTR e 3'UTR (*untranslated region*), estas regiões possuem aproximadamente 386 e 229 nucleotídeos, respectivamente (COLLET et al., 1988). O envelope é formado por uma membrana lipídica derivada de membranas celulares e contém pelo menos três glicoproteínas codificadas pelo vírus, sendo elas: E^{ms} (gp48), E1 (gp25), E2 (gp53) (DONIS, 1995). As proteínas presentes no envelope são alvos do sistema imune do hospedeiro e apresentam grande variabilidade antigênica (CORAPI et al., 1990; NEILL, 2013).

O BVDV pode infectar *in vitro* uma variedade de cultivos celulares de origem bovina, ovina, suína, canina, felina, humana entre outras (DEZENGRINI et al., 2006; FLORES & DONIS, 1995; OLIVEIRA et al., 1996; RIDPATH et al., 2003). As amostras virais quando infectam células de cultivo podem apresentar dois biótipos distintos, sendo denominadas de amostras não citopáticas (NCP) e citopáticas (CP) (BROWNLIE, 1990; RIDPATH, 2003). A grande maioria das amostras circulantes na natureza (> 95%) é constituída por vírus NCP, que

não alteram a morfologia do cultivo celular (ausência de citopatologia). As amostras denominadas de CP produzem alterações morfológicas nas células de cultivo que induzem a morte celular e a formação de efeitos citopáticos (BROWNLIE, 1990). Os vírus CP são gerados a partir de mutações na região que codifica a proteína NS2-3. Ambos os biotipos possuem a proteína NS2-3, mas somente nos vírus CP ela é clivada gerando outra proteína, a NS3. Desta forma, a citopatologia está associada com a expressão da proteína NS3 (p80) nas amostras CP do BVDV (DONIS, 1995). As amostras CP são isoladas quase que exclusivamente de casos da Doença das Mucosas (DONIS, 1995).

A variabilidade genética e antigênica do BVDV é uma característica marcante entre os diferentes isolados. Esta variabilidade possui consequências diretas na classificação dos vírus, no emprego das técnicas de diagnóstico e nos métodos de controle da infecção em rebanhos. As diferenças genéticas possibilitam a diferenciação em duas espécies reconhecidas (BVDV-1, BVDV-2), um novo grupo denominado de BVDV-3 e algumas amostras identificadas como atípicas. Os BVDV-3 representam amostras identificadas a partir dos anos 2000 em diversas regiões do mundo e com possível origem em amostras de soro fetal bovino da América do Sul. As amostras consideradas atípicas foram isoladas de animais selvagens, *Giraffe* isolado de girafa no Kenya (BECHER et al., 2003), *Pronghorn* vírus isolado de antílope nos EUA (VILCEK et al., 2005), *Bungowannah* vírus isolado em suíno na Austrália (KIRKLAND et al., 2007) sendo que inicialmente os BVDV-3 foram classificados no grupo dos atípicos.

A caracterização genética de uma amostra viral é realizada pela análise e diferenças de sequências das regiões 5'UTR, N^{pro} e E2 (LIU, 2009). Ainda, dentro das espécies de BVDV existem subespécies, sendo que no BVDV-1 são identificadas 11 subespécies (BVDV-1a ao BVDV-1k), o BVDV-2 possui 2 subespécies (BVDV-2a e BVDV-2b) (FLORES et al., 2002; RIDPATH et al., 1994) e mais recentemente foi sugerido que o BVDV-3 pode ser subdividido em 4 subespécies (BVDV-3a até BVDV-3d) (GIAMMARIOLI et al., 2015). As proteínas presentes no envelope (E^{ms}, E1 e E2) são alvos do sistema imune do hospedeiro e possuem grande variabilidade. Esta característica observa-se especialmente na proteína E2, que é proteína mais imunogênica (BOTTON et al., 1998a). A diversidade antigênica possui consequência direta no diagnóstico, controle e eficiência das vacinas (FLORES et al., 2005).

A infecção de um bovino susceptível ao BVDV pode ocasionar desde uma infecção subclínica até o desenvolvimento de enfermidade fatal (BAKER, 1995; BOLIN, 1995; BROWNLIE, 1990). A apresentação clínica e severidade da doença dependem de características importantes, como genótipo e amostra viral, idade, *status* imunológico e

reprodutivo do hospedeiro e infecções concomitantes com outros patógenos (RIDPATH, 2010). O vírus é transmitido entre animais principalmente por contato direto e indireto, porém também pode ser transmitido de forma iatrogênica (agulhas, material cirúrgico, luvas de palpação, tatuadores, aplicadores de brinco) (RIDPATH; FLORES, 2007).

Uma característica observada nos animais infectados pelo vírus é a imunossupressão, seguida da ocorrência de infecções secundárias (POTGIETER, 1995). O período de incubação varia entre 3 e 7 dias e é seguido de hipertermia transitória e leucopenia, com o vírus sendo detectado no sangue entre 2 e 6 dias após a infecção e podendo persistir por até 15 dias (RIDPATH; FLORES, 2007). Os animais que desenvolvem sinais clínicos podem apresentar doença respiratória, digestória, doenças das mucosas, transtornos reprodutivos, alterações no desenvolvimento do feto e doença hemorrágica (RIDPATH, 2010). Desta forma, as consequências são a queda na produção, desenvolvimento dos animais, redução os índices reprodutivos e aumento da mortalidade de animais jovens.

A infecção do BVDV pode ocorrer em animais não prenhes ou fêmeas gestantes com consequências diferentes, que pode levar a formação de animais PI. As infecções agudas de animais não prenhes geralmente são assintomáticas, mas podem cursar com quadros febris leves, muitas vezes imperceptíveis ou então apresentar os sinais mencionados anteriormente (RIDPATH; FLORES, 2007). A infecção aguda de uma vaca gestante pode levar a transmissão vertical do vírus, atravessando a placenta e infectando o feto. As consequências para o feto serão determinadas pela idade gestacional, biótipo e amostra viral. Assim sendo, após a infecção fetal com uma amostra NCP do BVDV, pode-se observar morte embrionária, aborto, mumificação fetal, teratogenia, natimortos, nascimentos de terneiros fracos e inviáveis e o nascimento de animais persistentemente infectados (PI) (BAKER, 1995). Os animais PI são gerados quando vacas prenhes são infectadas entre os dias 40 e 120 da gestação. Após o nascimento, estes animais mantem a replicação viral no seu organismo e excretam o vírus constantemente nas secreções e excreções. Estes animais são considerados os mantenedores dos vírus na natureza e devem ser o alvo de todo o programa de controle da infecção. Nos animais PI, entre os seis e 24 meses de idade é comum o desenvolvimento de uma enfermidade aguda e altamente fatal, chamada de Doença das Mucosas (DM) (BROWNLIE, 1990; McCLURKIN et al., 1985). A etiologia da DM está associada com uma superinfecção do animal PI, com uma amostra CP originária por mutação da amostra NCP (PETERHANS et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial deve ser executado quando se suspeita de uma infecção pelo BVDV (OIE, 2008). O isolamento viral é utilizado para a identificação do vírus em amostras

de sangue, secreções ou tecidos. A detecção de antígenos virais pela técnica de imunohistoquímica ou ELISA, em fragmentos de tecidos tem sido amplamente utilizada para diagnóstico de PI em rebanhos (OIE, 2008). A utilização de PCR para detecção de genomas virais em tecidos e secreções também é uma alternativa, porém com custos mais elevados (OIE, 2008). O diagnóstico sorológico empregando testes de soroneutralização (SN) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) detecta a presença de anticorpos.

O controle da infecção pode ser efetuado dependendo do histórico do rebanho. A identificação do animal PI é o ponto central das medidas de controle da infecção, pois este é considerado a principal fonte de infecção e manutenção do vírus no rebanho, assim protegendo animais susceptíveis (BOLLIN, 1995; DUBOVI, 1992). Ainda, pode-se utilizar vacinação como uma medida para reduzir a disseminação do agente entre os animais se baseando em uma análise de riscos e custos (HOUE et al., 2006). A prevenção é realizada pela vacinação e aquisição de animais não infectados (RIDPATH; FLORES, 2007).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar os aspectos clínicos e virológicos da infecção aguda de bezerros com a amostra brasileira do BVDV-1a 241.10, bem como o papel de animais infectados na transmissão do vírus.

2 CAPÍTULO 1

Aspectos clínicos e virológicos da infecção de bezerros por um isolado brasileiro do vírus da diarreia viral bovina tipo 1a

Luana Marchi Quadros¹, José Conrado dos Santos Jardim², Ingrid Merchioratto²,
Mario Celso Sperotto Brum^{3*}

Artigo a ser submetido ao periódico Ciência Rural, 2015.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana, Brasil.

² Bolsista Iniciação Científica, Laboratório de Virologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana, Brasil.

³ Professor, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana, Brasil. *Autor para correspondência: Laboratório de Virologia, Curso de Medicina Veterinária, BR472, km 585, Caixa Postal 118, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, RS, Brasil, CEP 97.508-000. e-mail: mariobrum@unipampa.edu.br.

Aspectos clínicos e virológicos da infecção de bezerros por um isolado brasileiro do vírus da diarreia viral bovina tipo 1a

Clinical and virological aspects of infection of calves with a Brazilian isolate of bovine viral diarrhea virus type 1a

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é considerado um importante patógeno de bovinos e a sua infecção está amplamente disseminada no rebanho brasileiro. Com o objetivo de estudar a patogenicidade de uma amostra brasileira do BVDV-1a (241.10) não citopática quatro bovinos foram inoculados pela via intranasal com uma suspensão viral contendo $10^{7.2}$ TCID₅₀/ml. Um bezerro foi mantido em contato com o grupo infectado para avaliar a transmissibilidade. Após a inoculação, os animais foram monitorados diariamente para observação dos sinais clínicos. A presença de vírus no sangue e na secreção nasal foi realizada pelo isolamento viral em cultivo celular. A contagem total de leucócitos no sangue foi realizada a intervalos de três dias pré- e pós-infecção e a detecção de anticorpos a cada sete dias iniciando-se no dia 0 até o dia 42 pós-inoculação (pi). Após a inoculação não foram observados sinais clínicos evidentes, apenas secreção nasal e ocular serosa entre os dias 1 e 5 pi e tosse discreta entre os dias 2 e 4 pi. A temperatura corporal teve um leve aumento entre os dias 4 e 6 pi. O animal controle-contato não desenvolveu nenhum dos sinais observados no grupo infectado. O isolamento viral indicou presença de viremia entre os dias 4 a 8 pi e excreção viral na secreção nasal entre os dias 1 e 10 pi. Os animais inoculados apresentaram uma redução na contagem total de leucócitos no sangue. A detecção de anticorpos iniciou no dia 14 pi e os níveis mantiveram-se elevados até o dia 35 pi. No animal controle-contato não foi observado viremia, presença de vírus na secreção nasal e sorologia positiva, demonstrando ausência da transmissão. Assim sendo, conclui-se que a amostra de BVDV-1a 241.10 possui baixa patogenicidade, mantém a capacidade imunossupressora e tem baixa transmissibilidade.

Palavras-chave: Infecção experimental. Pestivírus. BVDV. Transmissão. Imunossupressão.

ABSTRACT

The bovine viral diarrhea virus (BVDV) is considered an important pathogen of cattle and their infection are widespread in the Brazilian herd. In order to study the pathogenicity of a sample of Brazilian BVDV-1a (241.10) four cattle were inoculated intranasally with a viral suspension containing 107.2 TCID₅₀ / ml. One non-inoculated cattle was kept in contact to assess the transmissibility. After inoculation, the animals were monitored daily to observe clinical signs. Presence of virus in blood and nasal secretions was performed by viral isolation in cell culture. The total leukocyte count in blood was performed at three days interval before and after infection and the detection of antibodies at every seven days starting in the day 0 until the 42 post-inoculation(pi). After inoculation no obvious clinical signs were observed, only nasal and ocular serous secretion between days 1 and 5 pi and discreet cough from day 2 and 4 pi. Body temperature increased slightly between the days 4 and 6 pi. Animal Control did not develop any of the signs observed in the infected group. Viral isolation indicated the presence of viremia between days 4 and 8 pi and virus excretion in nasal secretion between days 1 and 10. The inoculated animals showed a decrease in total leukocyte count in the blood. The detection of antibodies began on day 14 pi and the levels remained high until day 35 pi. In animal control was not observed viremia, the presence of virus in nasal secretion and positive serology, demonstrating the absence of transmission. Therefore, it is concluded that the sample BVDV-1a 241.10 has low pathogenicity, retains the immunosuppressive capacity and has low transmissivity.

Key words: Experimental infection. Pestivirus. BVDV. Transmission. Immunosuppression.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno de bovinos e está disseminado entre os rebanhos do mundo e do Brasil (FLORES et al., 2000). As perdas produzidas pela infecção são decorrentes das manifestações clínicas que podem cursar com sinais entéricos, respiratórios, hemorrágicos e reprodutivos (BIANCHI et al., 2011; BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 2000; HOUE, 2003). Ainda, o BVDV é um agente imunossupressor, e possibilita a instalação de infecções secundárias, como no caso das infecções do sistema respiratório (POTGIETER, 1995).

O BVDV é um vírus que pertence ao gênero *Pestivirus*, da família *Flaviviridae*. Estruturalmente os vírions possuem um genoma RNA, fita simples, cadeia positiva com tamanho de 12,5 kb, um capsídeo icosaédrico e envolto por um envelope lipoprotéico. As partículas medem entre 40-60 nm de diâmetro (HORZINEK, 1991). A variabilidade genética e antigênica observada entre os pestivírus possibilita diferenciá-los em quatro espécies, sendo o vírus da Peste Suína Clássica (CSFV), vírus da Doença da Fronteira (BDV) e os BVDV-1 e BVDV-2. Ainda, existem quatro novos grupos virais (*Pronghorn*, *Giraffe*, *Bungowannah* e BVDV-3 ou *Hobi-like virus*). Entre estes novos isolados, somente o BVDV-3, primeiramente identificado como *Hobi like virus*, foi isolado em várias ocasiões. Os outros três vírus foram isolados de animais silvestres ou suínos em uma única oportunidade (BAUERMAN et al., 2013).

No Brasil o BVDV já foi isolado de casos de enfermidades respiratórias, entéricas, hemorrágicas, abortos, sêmen, doenças das mucosas, animais com baixo desenvolvimento e animais persistentemente infectados (PI) e de amostras de soro fetal bovino (BIANCHI et al., 2011; BOTTON et al., 1998b; FLORES et al., 2000; OLIVEIRA et al., 1996). A caracterização genética e antigênica destas amostras revelou ampla variabilidade, sendo possível detectar os três genótipos e algumas variantes, no entanto, existe uma elevada frequência de amostras do BVDV-1 e BVDV-2 e alguns relatos de BVDV-3 (BIANCHI et al., 2011; CORTEZ et al., 2006; FLORES et al., 2000; WEBER et al., 2014). Entre as amostras de BVDV-1, os subgenótipos 1a e 1b são os mais presentes (BIANCHI et al., 2011; CORTEZ et al., 2006). A circulação do BVDV-2 entre os rebanhos brasileiros é uma constante, sendo que a sua frequência é mais elevada quando comparada com outras regiões do mundo. Ainda, estes vírus podem ser classificados em um subtipo diferente das amostras isoladas na América do Norte (FLORES et al., 2002; WEBER et al., 2014). A partir dos anos 2000 detectou-se a presença de amostras de BVDV-3 circulando no rebanho brasileiro; no entanto, em menor número quando comparado com os genótipos 1 e 2 (CORTEZ et al., 2006; BIANCHI et al., 2011; WEBER et al., 2014).

Os princípios do controle da infecção pelo BVDV em um rebanho baseiam-se na detecção da circulação do agente, observação de manifestações clínicas ou na avaliação do risco de introdução do vírus na propriedade. Assim, medidas que interrompam a transmissão e possibilitem a detecção das fontes de infecção, especialmente os animais PI, devem ser adotadas (BOLIN, 1995). As vacinas são uma importante ferramenta de auxílio no controle e prevenção do BVDV (HOUE et al., 2006). No Brasil oito vacinas para o BVDV são comercializadas, sendo que na sua composição possuem cepas de BVDV-1 e BVDV-2.

Porém a vacinação atinge uma parcela reduzida dos rebanhos e, em muitos casos, não é realizada de forma sistemática. (FLORES et al., 2000).

Assim sendo, constata-se a ampla disseminação do vírus nos rebanhos, uma grande variabilidade entre as amostras e medidas de controle e prevenção sendo adotadas de forma equivocadas. Desta forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a patogenicidade de um isolado brasileiro de BVDV-1a 241.10 em bezerros. Este subtipo viral está amplamente disseminado no rebanho e a determinação dos parâmetros clínicos e virológicos são de extrema importância na compreensão da infecção e na aplicação de métodos de diagnóstico e controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Células e vírus: Os procedimentos de multiplicação e isolamento viral foram realizados em células de linhagem de rim bovino (MDBK *Madin Darby bovine kidney* – ATCC CCL-22), livres de pestivírus. A manutenção das células foi realizada com meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1,6 mg/L) e estreptomicina (0,4 mg/L), suplementado com 5 % de soro equino (BOTTON et al., 1998). Para inoculação dos animais utilizou-se a amostra não citopatogênica BVDV-1a 241.10, isolada de um rebanho com problemas reprodutivos, e para sorologia foi empregada à amostra padrão Singer. As células e amostras virais foram gentilmente cedidas pelo Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Animais: cinco bovinos machos, com idade entre dois a quatro meses, soronegativos para BVDV e livre de vírus foram usados no experimento. Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum*. Quatro bezerros (números 1, 4, 8 e 9) foram inoculados via intranasal com uma suspensão de 5 mL de cultivo celular em cada narina contendo $10^{7,2}$ TCID₅₀/ml. Um bezerro (número 10) foi denominado controle-contato, não inoculado foi mantido em contato durante todo o experimento. Os animais foram mantidos em adaptação durante um período de quinze dias antes da infecção e posteriormente permaneceram em observação até o dia 42 pós-inoculação (pi). O dia da inoculação foi determinando como sendo o dia 0 pi. Durante todo o período os animais foram monitorados diariamente e as alterações clínicas (apatia, presença de secreções, consistência das fezes, mucosas, temperatura e consumo de alimento) foram registradas.

Isolamento viral: Para a pesquisa viral no sangue (viremia) e em secreções nasais utilizou-se isolamento em cultivo celular. As amostras de sangue foram coletadas via venopunção jugular nos dias -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 pi. As secreções nasais foram coletadas nos dias -3 até 15 pi com auxílio de *swabs* nasais e meio contendo 5 x antibióticos. Placas de 24 cavidades contendo monocamadas de MDBK pré-formadas foram inoculadas com amostras (200µL) de leucócitos ou *swabs nasais*, sendo realizadas três passagens dos sobrenadantes das culturas a cada 72 horas. Ao final da terceira passagem as células foram submetidas ao teste de imunofluorescência indireta para detecção da presença viral (BOTTON et al., 1998).

Contagem leucocitária: Amostras de sangue foram coletadas nos dias -3, 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pi, coradas com solução de Türk e a contagem de leucócitos total foi realizada em câmara de Neubauer. As contagens de leucócitos nos dias -3 e 0 pi foram consideradas normais e comparadas com os resultados dos dias pós inoculação (RIDPATH et al., 2013).

Sorologia: A presença de anticorpos anti-BVDV foi avaliada pelo teste de soro-neutralização frente ao vírus homólogo e a cepa padrão Singer (BOTTON et al., 1998) ou para anticorpos anti-proteínas não estruturais anti-p80 com uso da técnica ELISA de bloqueio (IDEXX BVDV p80 Ab Test). Amostras de soro foram coletadas nos dias 0, 6, 14, 21, 35 e 42 pi.

RESULTADOS

No período de adaptação os animais não apresentaram nenhuma alteração clínica e/ou no comportamental. Somente um animal (n. 4) possuía secreção ocular serosa unilateral que se manteve durante todo o experimento. Esta secreção não teve nenhuma relação com causa infecciosa. A inoculação foi realizada via intranasal pela fricção de *swabs* contendo o vírus na e animal controle (n. 10) foi mantido em contato para a avaliação da transmissão do vírus. Os sinais clínicos foram observados nos animais inoculados entre os dias 1 e 6 pi. Todos os bezerros desenvolveram secreção nasal e ocular de consistência serosa entre os dias 1 e 5 pi e tosse entre os dias 2 e 6 pi. Alguns animais apresentaram secreções e/ou tosse em momentos alternados entre os dias 8 e 13 pi. Após a infecção os animais desenvolveram leve e discreto aumento da temperatura corporal (39,6° C) entre os dias 4 e 6 pi. Esta observação não foi classificada como hipertermia (> 40° C). No animal controle não foram observadas alterações nas secreções e comportamento e a variação da temperatura ocorreu dentro da faixa observada no período de adaptação.

A pesquisa de vírus nas secreções nasais e no sangue foi realizada pela inoculação em cultivo celular e identificação da presença viral por imunofluorescência. O vírus foi isolado no sangue de todos os bezerros infectados entre os dias 4 e 8 pi, demonstrando a eficiência da inoculação realizada. A presença viral nas secreções nasais foi observada entre os dias 1 e 6 pi de todos os animais inoculados. Os *swabs* nasais dos bovinos n. 8 e 9 também apresentaram vírus entre nos dias 9 e 10 pi. O animal controle-contato (n. 10) não apresentou isolamento viral positivo no sangue e nas secreções nasais em nenhum momento da avaliação. Isto indica que não houve transmissão do vírus entre os bezerros infectados e controle-contato.

A capacidade imunossupressora do BVDV-1a 241.10 foi avaliada pela contagem total dos leucócitos sanguíneos em todos os animais do estudo. A coleta de sangue para esta finalidade foi realizada em dias alternados conforme descrito no material e métodos, sendo que a contagem dos dias anteriores à infecção foi utilizada para estabelecer a média normal. No dia 3 pi todos os animais apresentaram redução na contagem total dos leucócitos, esta situação permaneceu até o dia 12 pi. O valor médio da redução detectado entre todos os animais foi de 20%. No entanto, entre os dias 6 e 9 pi a redução foi mais pronunciada e nos animais n. 8 e 9 atingiu a faixa entre 30 e 37% dos leucócitos totais. O animal controle não apresentou alterações neste parâmetro avaliado.

A resposta imune dos animais foi avaliada pela detecção de anticorpos neutralizantes pelo teste de soro-neutralização em microplacas com diluições na base 5 e pela detecção de anticorpos anti-p80 (proteína não estrutural) com uso de ELISA. A detecção de anticorpos neutralizantes foi realizada frente à cepa padrão Singer em todos os dias amostrados e frente à amostra homóloga nos dias 14, 21 e 42 pi. Nos dias 0 e 6 pi todos os animais permaneceram negativos para a presença de anticorpos. A soroconversão inicial dos bezerros inoculados ocorreu no dia 14 pi, sendo que todos animais apresentaram títulos frente ao vírus homólogo e a cepa Singer. Os títulos variaram entre 20 e 640 (GMT = 2,9) quando testados com o vírus homólogo e frente ao Singer os títulos variaram entre 10 e 320 (GMT = 2,4). Nas amostras subsequentes, os títulos permaneceram em elevação até o dia 35 e após apresentaram declínio. No entanto, a reatividade dos soros manteve-se em níveis superiores quando testadas frente ao vírus homólogo. O teste das amostras de soro pela técnica de ELISA indicou que no dia 14 pi apenas dois animais (n. 4 e n. 9) eram positivos. Porém, no dia 42 todos os quatro bezerros infectados foram positivos. O animal controle, que permaneceu como contato durante todo o experimento, não desenvolveu anticorpos neutralizantes ou anti-p80 em nenhum momento. O indica que não houve transmissão.

DISCUSSÃO

A infecção experimental de bezerros jovens com o isolado brasileiro do BVDV-1a revelou que esta amostra possui baixa patogenicidade e não foi transmitida para o animal controle-contato. Os bovinos quando expostos ao BVDV podem apresentar infecção subclínica ou então diversas manifestações clínicas (BOTTON et al., 1998; BIANCHI et al., 2011). A inoculação experimental de isolados de campos tem sido utilizada para estudar as características da infecção em condições controladas (BAUERMANN et al., 2013; BRUM et al., 2002; ODEON et al., 1999; RIDPATH et al., 2000). Este tipo de estudo possibilita a caracterização da infecção aguda, patogenia, resposta imune, proteção vacinal, avaliação de testes diagnósticos e formas de transmissão entre animais (BAUERMANN et al., 2013; BRUM et al., 2002). Apesar de não existir uma metodologia padrão para realizar este tipo de estudo, os resultados demonstram que a virulência entre as amostras é bastante variável (DECARO et al., 2012; RIDPATH et al., 2013). O vírus BVDV-1a 241.10 utilizado para inocular os bezerros representa um isolado circulante no rebanho brasileiro que é identificado frequentemente em rebanhos (BIANCHI et al., 2011; BOTTON et al., 1998; CORTEZ et al., 2006). A infecção não resultou em manifestações clínicas evidentes, sendo observado um aumento discreto das secreções nasais e oculares e a presença de tosse. Os sinais respiratórios são observados em casos de infecção natural (RIDPATH, 2010). No entanto, alterações leves e discretas no estado de saúde dos animais podem não ser detectados por produtores e/ou técnicos e, desta forma, o agente irá manter-se no rebanho.

A capacidade infectante da amostra foi demonstrada pela recuperação do vírus no sangue nos dias 4 até 8 pi e da secreção nasal dias 1 até 6 pi de todos os animais inoculados. A quantificação viral nestas amostras não foi realizada, porém estima-se que todos os isolamentos positivos possuíam entre 50 e 100 TCID₅₀/mL. Este limite foi determinado previamente em amostras de sangue infectadas experimentalmente com diversas concentrações do BVDV e submetidas ao isolamento viral (dados não mostrados). Uma característica do BVDV é a capacidade de induzir imunossupressão, consequência da replicação viral em células mononucleares (BAUERMANN et al., 2013; FALKENBERG et al., 2014). No presente estudo a contagem total dos leucócitos reduziu-se em todos os animais infectados após o dia 3 pi, sendo que dia 9 pi observou-se os maiores valores de redução (20-37%). Após este período, a contagem celular retornou aos valores próximos aos normais no dia 15 pi. A capacidade imunossupressora foi anteriormente associada com amostras de baixa e alta virulência. Nas amostras de reduzida virulência os sinais clínicos

foram leves e a leucopenia passageira. Porém, animais infectados com amostras de alta virulência desenvolveram sinais clínicos mais evidentes e a redução dos leucócitos foi mais intensa e permaneceu até o dia 14 pi (RIDPATH et al., 2013).

Apesar da comprovação da infecção através da viremia e a presença de vírus nas secreções nasais dos bezerros infectados, não foi possível detectar a transmissão do BVDV para o animal controle-contato. Os resultados do isolamento viral (sangue e secreção nasal), da contagem de leucócitos e de sorologia permaneceram negativos ou inalterados no animal sentinela durante todo o período avaliado (42 pi). Apesar de todos os cinco bezerros serem mantidos em contato direto durante todo experimento a transmissão não ocorreu. Possivelmente, a ausência da transmissão deve-se ao fato dos animais infectados excretarem vírus em concentração reduzida para que ocorra a transmissão. A ausência de transmissão foi descrita em casos de infecção experimental (DECARO et al., 2012; RIDPATH et al., 2013). Isto pode ser uma característica de algumas amostras do vírus e reforça a importância dos animais PI na disseminação da infecção nos rebanhos (ARENHART et al., 2009).

O monitoramento sorológico foi realizado em intervalos regulares após a infecção, revelou que todos os bezerros infectados (4/4) desenvolveram anticorpos neutralizantes a partir do dia 14 pi. Nas coletas subsequentes os títulos elevaram-se até o dia 35 pi e no dia 42 pi apresentaram uma redução. A sorologia é um teste adicional para confirmar a infecção e a curva sorológica é característica da infecção pelo BVDV (BRUM et al., 2002). O padrão da curva sorológica manteve-se similar quando as amostras de soro foram testadas frente à cepa padrão Singer, porém com títulos levemente reduzidos. Esta diferença nos resultados é consequência da diversidade antigênica das amostras e é comumente observada em ensaios de sorologia cruzada (BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 2000). A proximidade entre os valores dos títulos deve-se ao fato de ambos os vírus pertencerem ao mesmo subtipo (BVDV-1a). No entanto, quando amostras positivas de soro são testadas frente a vírus de espécies e/ou subgenótipos heterólogos, a reatividade é reduzida (FLORES et al., 2000). Esta característica tem implicação direta nos testes de diagnóstico e eficácia de vacinas. Os soros de todos os animais coletados nos dias 14 e 42 pi foram submetidas ao teste ELISA para detecção de anticorpos anti-p80. Na primeira coleta somente dois animais (n. 1 e n.8) possuíam anticorpos para esta proteína, diferentemente do que ocorreu no dia 42 pi, onde todos os animais foram positivos. A comparação entre as duas técnicas revela que a SN foi capaz de detectar anticorpos de forma mais precoce. Porém, por detectar a reatividade contra uma proteína não estrutural e bastante conservada entre todos os isolados do BVDV, o teste de ELISA, é amplamente utilizado (CANAL et al., 1998; SANDVIK, 1999).

O controle do BVDV nos rebanhos tem como princípio a detecção de animais PI e a interrupção da infecção fetal (MOENNIG et al., 2005). Os animais PI podem ser detectados através de isolamento viral, ELISA, imunohistoquímica de biópsia auricular ou PCR (FLORES et al., 2005). Estas metodologias estão disponíveis em um número reduzido de laboratórios no Brasil (FLORES et al., 2005). Considerando-se o tamanho do rebanho bovino nacional, a demanda destes exames por parte dos técnicos de campo é bastante reduzida (FLORES et al. 2005). A infecção fetal é controlada evitando-se que fêmeas prenhes entrem em contato com o vírus ou através da imunização com vacinas (DEZEN et al., 2013). A maioria das vacinas para o BVDV comercializadas no Brasil são compostas por amostras do tipo 1 e/ou 2 e tem imunogenicidade questionável (ANZILIERO et al., 2015; FLORES et al., 2002). Estudos de Dezen et al. (2013), demonstraram que em um rebanho vacinado a presença de animais PI não foi evitada, indicando que somente a vacinação não é suficiente para eliminar a infecção. A associação deste cenário com a presença de amostras de baixa patogenicidade, como a utilizada no presente estudo dificultam a identificação de casos clínicos e contribuem para a disseminação do BVDV nos rebanhos.

CONCLUSÃO

O vírus BVDV-1a 241.10 possui baixa patogenicidade para bezerros, pois produziu um aumento discreto e passageiro das secreções nasais e oculares. Porém, mantém a capacidade imunossupressora transitória. A presença de anticorpos neutralizantes foi detectada inicialmente no dia 14 pi, sendo detectados anticorpos neutralizantes e anti-p80 em pelos dois animais inoculados. Ainda, a amostra viral utilizada possui reduzida capacidade de transmissão, uma vez que o animal contato não foi infectado. Assim sendo, demonstrou-se que a infecção pelo BVDV pode ocorrer de forma discreta e silenciosa entre os bovinos e que as medidas de controle devem sempre objetivar a identificação dos animais PI, pois são estes que servem de fonte de infecção do vírus para os rebanhos.

AGRADECIMENTOS

Aos bolsistas do Laboratório de Virologia pelo auxílio laboratorial e cuidados com os animais. Aos técnicos terceirizados da UNIPAMPA pela manutenção dos animais. Ao setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria pela cedência dos cultivos celulares e amostras virais. A Prof^a. Francieli W. S. Cibir pelo auxílio com as avaliações hematológicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 486302/2013-0 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) ARD 010-0222-0 pelo auxílio financeiro.

APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE USO EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A utilização, manutenção e manipulação dos animais seguiram as normas de bem estar animal e foram devidamente aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Pampa (sob registro nº 010/2015) e recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS

ANZILIERO, D. et al. Resposta sorológica aos herpesvírus bovino tipo 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. et al. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 736-742, 2009.

BAUERMANN, F. V. et al. Hobi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, p. 6-15, 2013.

BIANCHI, E. et al. Perfil genotípico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 649-655, 2011.

BOLIN, S. Control of bovine viral diarrhea virus infection by use of vaccination. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 615-626, 1995.

BOTTON, S. A. et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, n. 11, p. 1429-1438, 1998.

BRUM, M. C. S. et al. Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da diarreia viral bovina tipo 2 (BVDV-2). **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 803-820, 2002.

CANAL, W. C. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.63, p. 85-97, 1998.

CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006.

DECARO, N. et al. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with “Hobi”-like pestivirus. **Veterinary Microbiology**. v. 155, p. 165-171, 2012.

DEZEN, S. et al. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 141-147, 2013.

FALKENBERG, S. M. et al. Changes observed in the thymus and lymph nodes 14 days after exposure to BVDV field strains of enhanced or typical virulence in neonatal calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 160, n. 1-2, p. 70-80, 2014.

FLORES, E. F. et al. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 11-17, n. 1, 2000.

FLORES, E. F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, n. 87, p. 51-60, 2002.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

HORZINEK M. C. Pestivirus: taxonomic perspectives. **Archive of Virology** (suppl, 3): p. 1-5, 1991.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**. v. 31, p. 137-143, 2003.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 427-436, 2006.

MOENNIG, V.; HOUSE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2005.

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

OLIVEIRA, L. G. et al. Presença de pestivírus e anticorpos contra pestivírus em soros e cultivos celulares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 5, p. 513-23, 1996.

POTGIETER, A. N. D. Immunology of BVDV. In: Bovine Viral Diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 501-520, 1995.

RIDPATH, J. F. et al. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 145-155, 2000.

RIDPATH, J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, n. 26, n. 2, p. 335-348, 2010.

RIDPATH, J. F. et al. Comparison of acute infection of calves exposed to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhoea virus or a HoBi-like virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 3, p. 438-442, 2013.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, n. 64, p. 123-134, 1999.

WEBER, N. M. et al. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v. 191, p. 117-124, 2014.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vírus da diarreia viral bovina possui uma distribuição mundial e produz perdas econômicas consideráveis (FLORES et al., 2005; HOUE, 2003). No Brasil, a prevalência precisa é difícil de calcular devido às características da produção diversificadas (FLORES et al., 2005). No entanto, estudos sorológicos demonstram uma variabilidade nos índices de prevalência, porém estima-se que a infecção está presente em mais de 50% das propriedades e entre 30-40% dos animais possuem anticorpos (FLORES et al., 2005). A presença viral já foi detectada em amostras de animais com manifestações clínicas (respiratória, diarreia, problemas reprodutivos e doenças hemorrágicas), de animais persistentemente infectados, sêmen e de amostras de soro fetal bovino (BIANCHI et al., 2011; BOTTON et al., 1998b). A reunião de todos estes achados demonstra a importância que o BVDV possui para pecuária nacional.

Uma característica entre os diferentes isolados de BVDV, no mundo e no Brasil, é a variabilidade genética e antigênica. Esta característica possui como consequência a geração de amostras de patogenicidade variada (BOTTON et al., 1998b; CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2000; OLIVEIRA et al., 1996). Desta forma, a ocorrência de infecções subclínicas ou com manifestação clínica discreta é uma realidade muitas vezes não detectada. Esta situação dificulta o diagnóstico e adoção de medidas de controle, como por exemplo, a detecção de animais PI e/ou implementação de vacinação (FLORES et al., 2005; HOUE, 2003).

O presente estudo teve como objetivo a avaliação dos aspectos clínicos e virológicos da inoculação de bezerros com a amostra 241.10 do vírus da diarreia viral bovina BVDV-1, subtipo 1a. A amostra utilizada no experimento foi isolada no Brasil e originária de um rebanho com problemas reprodutivos. A inoculação dos animais pela via intranasal com dose superior a 10^7 TCID₅₀ simulou a rota de infecção natural de bezerros. Os animais inoculados desenvolveram sinais clínicos discretos e moderados, onde observou-se aumento da secreção nasal e ocular, e leve aumento da temperatura corporal. Ainda, houve redução da contagem total de leucócitos em todos os animais inoculados. A detecção de anticorpos neutralizantes iniciou-se no dia 14 pós-inoculação, elevaram e mantiveram-se até o dia 42 pós-inoculação. O animal mantido como controle e contato, não demonstrou nenhuma manifestação clínica ou achado laboratorial indicativo de infecção. Ainda, o animal não desenvolveu anticorpos neutralizantes ou anticorpos anti-p80 detectados por ELISA, em nenhum momento do experimento.

Em resumo, os resultados do experimento indicam que a virulência da amostra BVDV-1a 241.10 é baixa e as manifestações clínicas produzidas pela infecção experimental foram discretas. No entanto, um achado relevante foi à capacidade imunossupressora, mesmo em uma amostra de baixa virulência. A transmissão do vírus não foi observada, o que reforça a importância dos animais persistentemente infectados na disseminação e na manutenção da infecção em rebanhos. Estes dados reforçam o conhecimento de que o BVDV é um importante agente para bovinos, podendo estar associado com infecções clínicas discretas e/ou então agir como um agente imunossupressor. Desta forma, as medidas de controle e prevenção da infecção pelo BVDV devem ser consideradas, além das consequências clínicas, a possibilidade de infecções subclínicas no rebanho.

REFERÊNCIAS

BAKER, John C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425-446, 1995.

BECHER, Paulo et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, p. 96-104, 2003.

BIANCHI, Eloisa et al. Perfil genotípico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 649-655, 2011.

BOLIN, Steven R. Control of bovine viral diarrhea virus infection by use of vaccination. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 615-626, 1995.

BOTTON, Sônia de Avila et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, n. 11, p. 1429-1438, 1998a.

BOTTON, Sônia de Avila et al. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 84-92, 1998b.

BROWNLIE, Joe. The pathogenesis of bovine virus diarrhea virus infections. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 9, p. 43-59, 1990.

CANAL, Claudio Wageck et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 85-97, 1998.

COLLETT, Marc S. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the Pestivirus bovine viral diarrhea virus. **Virology**, v. 165, n. 1, p. 191-199, 1988.

CORAPI, Wayne V.; DONIS, Ruben O.; DUBOVI, Edward J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinarian Research**, v. 51, p. 1388-1394, 1990.

DEZENGRINI, Renata; WEIBLEN, Rudi; FLORES, Eduardo Furtado.; Selection and characterization of canine, swine and rabbit cell lines resistant to bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**, v. 137 p. 51-57, 2006.

DONIS, Ruben O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 393-423, 1995.

DUBOVI, Edward J. Genetic diversity and BVD virus. **Compendium of Immunology and Microbiology of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 155-162, 1992.

FLORES, Eduardo Furtado et al. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, 2000.

FLORES, Eduardo Furtado; DONIS, Ruben O. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection due to a block in viral entry. **Virology**, v. 208, p. 565-575, 1995.

FLORES, Eduardo Furtado. et al. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125- 134, 2005.

FLORES, Eduardo Furtado et al. 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.

GIAMMARIOLI, Monica et al. Genetic detection and characterization of emerging Hobi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. **Biologicals**, v. 43 p. 220-224, 2015.

HORZINEK, Marian C. Pestivirus: taxonomic perspectives. **Archive of Virology** (suppl, 3): p. 1-5, 1991.

HOUE, Hans. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**. v. 31, p. 137-143, 2003.

HOUE, Hans; LINDBERG, Ann.; MOENNIG, Volker. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 427- 436, 2006.

KIRKLAND, Peter D. et al. Identification of a novel virus in pigs - Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. **Virus Research**, v. 129 p. 26-34, 2007.

LINDBERG, Ann.; ALENIUS Stefan. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 197-222, 1999.

LIU, Lihong. et al. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, p. 351-357, 2009.

MCCLURKIN, A. W.; BOLIN, Steven R.; CORIA, M. F. Isolation of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 186, p. 568-575, 1985.

NEILL, John D. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 41, p. 2-7, 2013.

OIE, Terrestrial Manual In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Bovine viral diarrhoea. **Office of International Epizootics**, p. 698-711, 6th ed. Paris, 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D7709.PDF>> Acesso em: 1 de Set de 2015.

OLIVEIRA, L. G et al. Presença de pestivírus e anticorpos contra pestivírus em soros e cultivos celulares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 5, p. 513-23, 1996.

PETERHANS, Ernst et al. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v. 41, 2010.

POTGIETER, Leon N. Immunology of BVDV. In: Bovine Viral Diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, p. 501-520, 1995.

RIDPATH, Júlia F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, p. 127-131, 2003.

RIDPATH, Júlia F.; FLORES, Eduardo Furtado. Flaviviridae. In: FLORES, Eduardo Furtado (Ed.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 563-592.

RIDPATH, Júlia F.; BOLIN, Steven; DUBOVI, Edward. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74, 1994.

VILCEK, Stefan et al. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, p. 187-193, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 010/2015

Título: Caracterização da infecção aguda de bezerros pelo vírus da diarreia viral bovina tipo 3

Data da aprovação: 29/04/2015

Período de vigência do projeto: De: 04/2015 Até: 04/2018

Pesquisador: MÁRIO CELSO SPEROTTO BRUM

Campus: URUGUAIANA

Telefone: (55) 99514661

E-mail: mariobrum@unipampa.edu.br

Digitally signed by ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU
NEIS:98256009004
DN: cn=ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU
NEIS:98256009004, c=BR, o=ICP-Brasil, ou=RFB e-CPF A3, email=alessandratamajusuku@unipampa.edu.br

Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA

ANEXO B – Resultados do isolamento viral no sangue e nas secreções nasais

TABELA 1 – Presença viral no sangue (viremia) de bezerros inoculados com uma amostra brasileira do vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

Bezerro	Dias pós-inoculação								
	-3	0	2	4	6	8	10	12	14
1	- ¹	-	-	+ ²	+	+	-	-	-
4	-	-	-	+	+	-	-	-	-
8	-	-	-	+	+	-	-	-	-
9	-	-	-	-	+	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Isolamento viral negativo; ²Isolamento viral positivo

TABELA 2 – Excreção viral em *swabs* nasal de bezerros inoculados com uma amostra brasileira do vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

Bezerro	Dias pós-inoculação																
	-3	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	- ¹	-	+ ²	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Isolamento viral negativo; ²Isolamento viral positivo

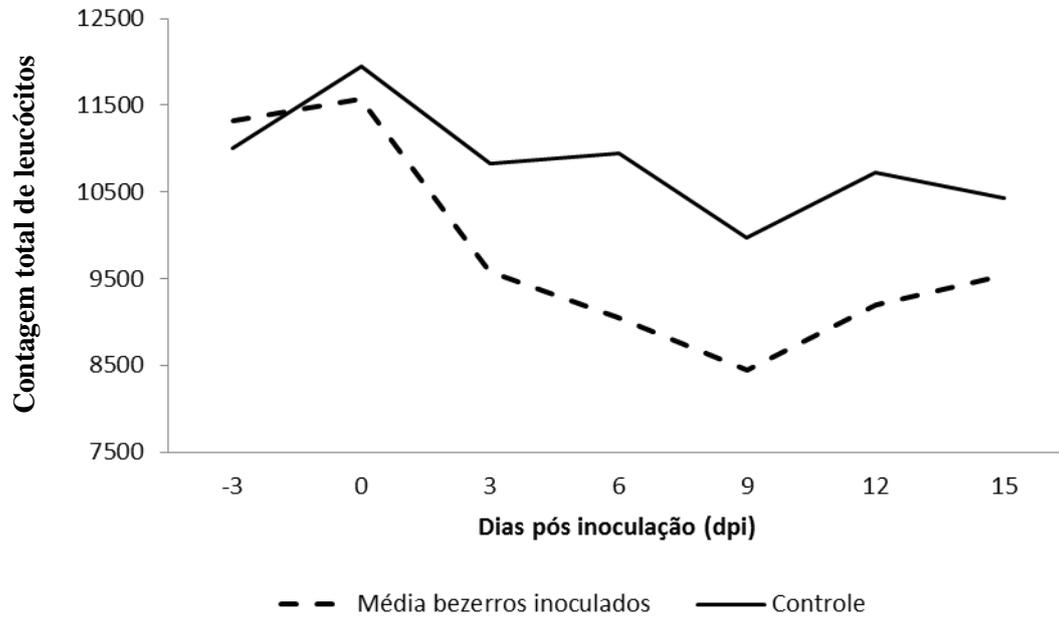
ANEXO C – Contagem de leucócitos totais

FIGURA 1 – Média da contagem de leucócitos totais nos animais inoculados por uma amostra brasileira do vírus da diarreia viral bovina tipo 1a (BVDV-1a) e do animal contato durante os dias -3 a 15 pós-infecção. Valores totais absolutos.

ANEXO D – Resultado da sorologia dos animais inoculados com BVDV-1a 241.10

TABELA 3 – Comparação dos níveis de anticorpos frente ao vírus homólogo, cepa Singer e proteína não estrutural p80 em bovinos detectados nos dias 14 e 42 pós-inoculação em bezerros inoculados com uma amostra do BVDV-1a 241.10.

Bezerro	Soroneutralização (SN)				ELISA	
	Anti-BVDV-1a 241.10		Anti-Singer		Anti-p80*	
	14 pi	42 pi	14 pi	42 pi	14 pi	42 pi
1	40	2560	20	320	0,086	0,818
4	320	10240	80	2560	0,465	1,355
8	20	2560	10	320	0,072	0,752
9	640	10240	320	640	0,353	1,460
10	0	0	0	0	0,138	0,098

*valores da razão S/P < 0,20 amostra negativa e valores \geq 0,20 amostra positiva.

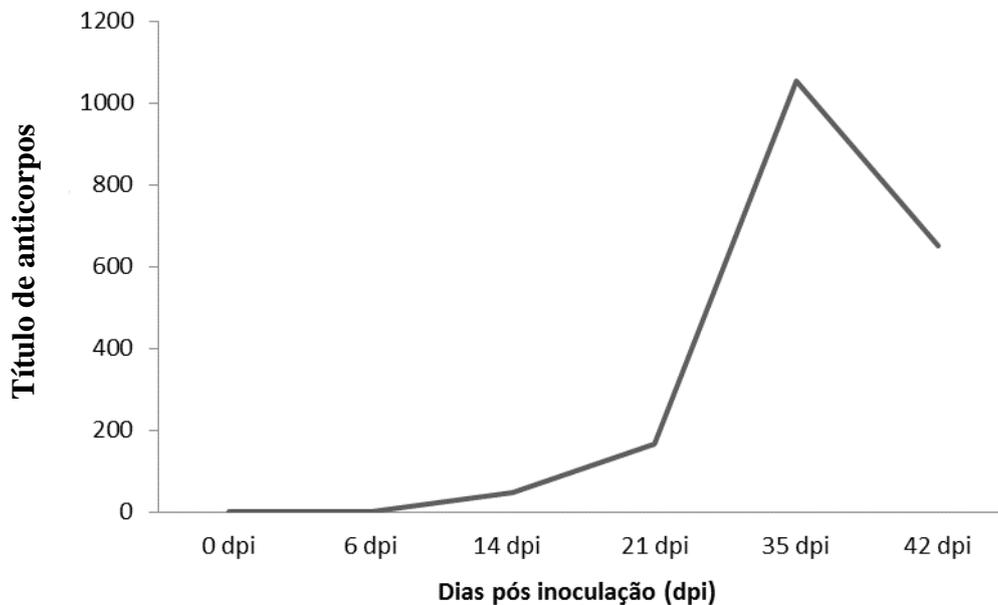


FIGURA 2 – Média da evolução dos anticorpos neutralizantes anti-Singer detectados nos bezerros inoculados com uma amostra brasileira do vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1a 241.10).