

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR A EXCREÇÃO
DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA POR LEITÕES
DESMAMADOS E TRANSMISSÃO VIRAL POR VIA
AERÓGENA**

**Anne Caroline Ramos dos Santos
Médica Veterinária**

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR A EXCREÇÃO
DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA POR LEITÕES
DESMAMADOS E TRANSMISSÃO VIRAL POR VIA
AERÓGENA**

Anne Caroline Ramos dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Andressa de Souza Pollo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Preventiva)

2016

S237i Santos, Anne Caroline Ramos dos
Infecção experimental para avaliar a excreção do vírus da diarreia viral bovina por leitões desmamados e transmissão viral por via aerógena / Anne Caroline Ramos dos Santos. -- Jaboticabal, 2016 x, 42 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Luís Guilherme de Oliveira
Co-orientadora: Andressa de Souza Pollo
Banca examinadora: João Pessoa Araújo Junior, Hélio José Montassier
Bibliografia

1. *Pestivirus*. 2. BVDV. 3. Suíno. 4. RT-PCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.578,81:636.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INFECÇÃO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR A EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA POR LEITÕES DESMAMADOS E TRANSMISSÃO VIRAL POR VIA AERÓGENA

AUTORA: ANNE CAROLINE RAMOS DOS SANTOS

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

COORDENADORA: ANDRESSA DE SOUZA POLLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JOÃO PESSOA ARAUJO JUNIOR
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Botucatu/SP



Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANNE CAROLINE RAMOS DOS SANTOS – nascida em 02 de fevereiro de 1990, em Itapeva, SP, é Médica Veterinária formada pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Associação Cultural e Educacional de Garça, SP, em janeiro de 2012. Concluiu a graduação com o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Manejo Reprodutivo em Matrizes Suínas”. Em 2014, ingressou no curso de Pós-Graduação, Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Medicina Veterinária Preventiva, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira e co-orientação da Dra. Andressa de Souza Pollo.

“Só se anda uma vez na roda-gigante. A vida era para quem se arriscava”

Charles Bukowski

Dedico primeiramente a Deus, pois Nele tudo posso.
Agradeço a insistência, sabedoria, paciência e amor de minha mãe.
Ao apoio da minha família e amigos.
Sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de Jaboticabal pela oportunidade de ensino.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos nos meses do curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio financeiro que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa finalizado nessa dissertação.

Ao Laboratório de Pesquisas em Suínos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da FCAV/UNESP Jaboticabal que disponibilizaram a estrutura necessária para o realização desse trabalho.

Ao meu orientador Luís Guilherme de Oliveira, pelo qual agradeço a oportunidade e obrigada por ter acreditado e apoiado o desenvolvimento do projeto. Agradeço também por esses dois anos de amizade e respeito.

À minha co-orientadora Andressa de Souza Pollo, pela qual adquiri profunda admiração. Por toda a estrutura do seu laboratório para o desenvolvimento do projeto, além de todo o conhecimento repassado e pela oportunidade de aprender inúmeras coisas que acrescentaram significativamente no meu desenvolvimento científico. Obrigada pela confiança, amizade e apoio, sem os quais não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica e Cirurgia e do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV/UNESP.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões que muito contribuíram para a conclusão dessa dissertação.

A todos os amigos do Laboratório de Pesquisas em Suínos que me apoiaram, me ajudaram e me escutaram nas fases mais difíceis, em especial Karla e Daniele.

A todas as amigas do Laboratório de Epidemiologia Molecular pela amizade, em especial Mariana, Roberta, Ingrid, Marita e Luciana que me acolheram e as quais tenho profunda admiração.

À minha família, em especial, Maria Aparecida, minha mãe, pelo amor e paciência dedicados por todos esses anos da minha vida e na minha jornada acadêmica.

E também a todos que não foram mencionados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Suinocultura Mundial	3
2.2. Sanidade Suína.....	4
2.3. Gênero <i>Pestivirus</i>	5
2.4. Vírus da Diarreia Viral Bovina	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Delineamento experimental	13
3.2. Descrição dos isoladores e entrada dos leitões	13
3.3. Seleção dos Animais.....	15
3.4. Inóculo	16
3.5. Coleta de amostras	16
3.6. Necropsia	17
3.7. Técnica de virusneutralização (VN)	18
3.7.1. Manutenção das culturas celulares	18
3.7.2. Propagação viral em cultivo celular.....	19
3.7.3. Determinação do título infectante viral	20
3.7.4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes	20
3.7.5. Controle das TCID ₅₀	21
3.8. Detecção do BVDV por RT-PCR	22
3.8.1. Extração de RNA	22
3.8.2. Síntese de cDNA	23
3.8.3. PCR	23
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO.....	33

7. REFERÊNCIAS.....	34
---------------------	----

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 07998/14 do trabalho de pesquisa intitulado **“Estudo epidemiológico de ocorrência e transmissão do vírus da diarreia viral bovina em suínos”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de maio de 2014.

Jaboticabal, 08 de maio de 2014.



Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

INFECÇÃO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR A EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA POR LEITÕES DESMAMADOS E TRANSMISSÃO VIRAL POR VIA AERÓGENA

RESUMO - O vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), do gênero *Pestivirus*, pode ocasionar significativas perdas econômicas em bovinos. No entanto, este vírus também pode infectar os suínos, nos quais a infecção por BVDV poderá ocasionar sinais clínicos, afetar a diagnose da PSC (Peste Suína Clássica), além de torná-los fonte de disseminação viral. Tendo em vista esta problemática, este trabalho teve por objetivo verificar se leitões infectados experimentalmente por BVDV podem passar a excretar o vírus e se a disseminação viral pode ocorrer por via aerógena. Para tanto, foram realizados dois experimentos. Em cada experimento, seis leitões foram distribuídos em duplas em três câmaras de isolamento, ligadas por tubos com fluxo de ar contínuo, nas quais os animais introduzidos corresponderam ao controle, infectado e sentinela, respectivamente. Os animais da segunda câmara foram inoculados pela administração de inóculo de BVDV-1 estirpe Singer citopático por via nasal e oral. Foram avaliadas amostras de sangue, suabe nasal e retal, e no último dia foi realizada eutanásia e necropsia dos animais e coletada amostras de tecidos. No primeiro experimento, ambos os animais inoculados soroconverteram e apresentaram sinais clínicos da infecção, mas somente em um animal foi detectada excreção do vírus por via nasal e presença de RNA viral nos rins, baço e fígado, avaliadas por RT-PCR. Neste caso, a transmissão do vírus por via aerógena não foi comprovada, uma vez que o experimento foi finalizado um dia após a excreção viral. Já no segundo experimento, os dois animais infectados soroconverteram com nove dias de diferença e apresentaram sinais clínicos da infecção, mas neste caso, não foi detectada a presença do vírus nas secreções coletadas e nos órgãos. A evolução da infecção mais acentuada nos animais do primeiro experimento, incluindo excreção viral, pode estar relacionada à imunossupressão ocasionada pelas elevadas temperaturas ambientais no período do estudo. No segundo experimento, a soroconversão, e a ausência de estresse térmico, podem ter sido suficientes para impedir a evolução da infecção. Como o curso da infecção depende da virulência da cepa viral e da resposta imune do suíno, no segundo experimento, os animais conseguiram debelar a infecção. Nos dois experimentos os animais controle e sentinela não apresentaram sinais clínicos de infecção, não soroconverteram e nem excretaram o vírus. Assim, concluiu-se que o BVDV-1 pode infectar suínos e provocar sinais clínicos de infecção e que esta pode evoluir para excreção viral e, inclusive, atingir os órgãos dos suínos, contudo a cepa viral utilizada demonstrou ser de baixa patogenicidade. Entretanto com o contato de animais com cepas virais de alta virulência, os suínos podem passar a ser uma fonte de infecção para outros suínos e bovinos. Como a transmissão viral pela via aerógena não foi provada, denota-se a necessidade da continuidade de estudos visando elucidar as vias de transmissão do BVDV entre suínos e entre estes e outros animais.

Palavras-chave: Pestivirus, BVDV, Suíno, RT-PCR.

EXPERIMENTAL INFECTION TO EVALUATE THE EXCRETION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA IN WEANED PIGLETS AND VIRAL AIRBORNE TRANSMISSION

ABSTRACT – The virus of Bovine Viral Diarrhea (BVDV), belonging to the *Pestivirus* genus, can cause significant economic losses in cattle. However, this virus can also infect swine, in which infection by BVDV may cause clinical signs, affect the diagnosis of CSF (Classical Swine Fever), and makes them a source of viral spread. Based on these issues, this study aimed to verify whether piglets experimentally infected by BVDV can shed the virus and whether viral airborne transmission is possible. For this, two experiments were carried out. In each experiment, six piglets were distributed in pairs in three isolation chambers, connected by continuous air flow tubes, in which the animals introduced corresponded to control, infected and sentinel, respectively. The animals present in the second chamber were inoculated with BVDV-1 strain Singer cytopathic inoculum by nasally and orally administration. Samples of blood, nasal and rectal swabs, and the last day was conducted euthanasia and necropsy of the animals and tissue samples were evaluated. In the first experiment, both inoculated animals seroconverted and showed clinical signs of infection, but only in one animal nasally virus shedding was detected, as well as, viral RNA presence in kidney, spleen and liver, both identified by RT-PCR. In this case, viral airborne transmission has not been confirmed, since the experiment was finalized one day after the viral shedding. In the second experiment, the two infected animals seroconverted with nine days apart and showed clinical signs of infection, but in this case, the presence of the virus in the collected secretions and organs was not detected. The development of stronger infection in the animals from the first experiment, including viral shedding, may be related to immunosuppression caused by high ambient temperatures during the study period. In the second experiment, seroconversion, and the absence of heat stress, may have been sufficient to prevent the spread of the infection. As the course of the infection depends on the virulence of the virus strain and the piglet immune response of the pig, in the second experiment, the animals were able to overcome the infection. In both experiments the control and sentinel animals did not show clinical signs of infection, did not seroconverted and did not shed virus. Thus, it was concluded that BVDV-1 can infect piglets and cause clinical signs of infection that can evolve to viral shedding and even reach the organs of piglets, but the viral strain used shown to be of low pathogenicity. However with the contact of animals with viral strains of high virulence, pigs can become a source of infection for other piglets and cattle. As viral airborne transmission was unproved, it denotes the need for studies continuation in order to elucidate the routes of BVDV transmission between piglets and between them and other animals.

Keywords: *Pestivirus*, BVDV, swine, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma patologia atípica nos suínos, o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) pode alojar-se nesses animais, tornando-os portadores do vírus. Alguns estudos conotam a ideia de que o vírus é transmitido por via aerógena, devido a proximidade de granjas com rebanhos bovinos, gerando um fator de risco para as criações, pois podem alcançar longas distâncias (WALZ et al., 2004).

O vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) ocasiona significativas perdas econômicas nas produções de gado de corte e leiteiro (ARENHART et al., 2008). Embora o nome do vírus BVDV seja relativo ao bovino, este patógeno pode afetar múltiplos órgãos em muitas espécies animais, como ovelhas, cabras, suínos, bisão, alpacas, lhamas e veados de cauda branca (WALZ et al., 2010).

As infecções pelo BVDV nos suínos ocorrem com certa frequência, especialmente em fazendas com criação de gado muito próximas (TERPSTRA e WENSVOORT, 1997). Embora em animais adultos sadios os sintomas da doença podem ser subclínicos, em animais imunossuprimidos e fêmeas gestantes, a infecção por BVDV pode ser fatal (FINO et al., 2012). O vírus pode ocasionar infertilidade temporária, reabsorção embrionária, abortos, natimortos, malformações e geração de bezerros persistentemente infectados (MOENNIG; BECHER, 2015).

O BVDV foi primeiramente descrito em 1946 ocasionando um surto da doença em bovinos no Canadá (OLAFSON; MACCALLUM; FOX, 1946) e, posteriormente, em 1968 no Brasil (CORREA; NETTO; BARROS, 1968). No entanto, somente em 1973, uma estirpe de BVDV foi isolada de leitões em Iowa, Estados Unidos da América. Esta estirpe mostrou-se virulenta a bezerros mesmo após uma série de inoculações em suínos e reisolamentos. Nesta ocasião, também foi relatado que o biotipo viral citopatogênico pode passar a não-citopatogênico em suínos, o que os torna uma fonte de disseminação do vírus (FERNELIUS et al., 1973).

Ao contrair o vírus, na maioria das vezes, os suínos não apresentam sinais clínicos da infecção, o que torna silenciosa a disseminação viral entre animais (WALZ et al., 2004). Os pestivírus de ruminantes apresentam infectividade relativamente limitada em suínos, no entanto, em animais imunossuprimidos a infecção pode afetar o sistema respiratório, digestivo, reprodutivo e circulatório (SILVA, 2011). Estes

sintomas podem ser confundidos com os sinais clínicos iniciais da PSC, uma importante doença em suínos que ocasiona grandes perdas econômicas (WIERINGA-JELSMA; QUAK; LOEFFEN, 2006; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2012).

A transmissão do BVDV entre suínos e bovinos requer contato direto entre estes animais, no entanto, a via de transmissão do vírus entre suínos ainda requer maiores informações (LEFORBAN; VANNIER; CARIOLET, 1992; TAO et al., 2013). Dada a problemática da infecção cruzada de BVDV entre bovinos e suínos, é de suma importância conhecer as vias de transmissão do vírus entre suínos, que por serem hospedeiros do vírus, podem ocasionar uma disseminação descontrolada do patógeno para o seu hospedeiro alvo. Desta forma, este trabalho visou verificar a possibilidade de excreção do BVDV por leitões infectados experimentalmente e a disseminação viral pela via aerógena.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Suinocultura Mundial

A carne suína é a mais consumida do mundo por ser magra e rica em nutrientes. No entanto, durante muitos anos, essa carne foi rotulada como calórica e rica em gorduras prejudiciais à saúde (GASTARDELO; MELZ, 2014). Em detrimento disto, criadores de suínos de vários países, investiram na melhoria da alimentação desses animais e em pesquisas, principalmente visando o melhoramento genético, que propiciou a redução da gordura intramuscular da carne suína para 1,5%, garantindo ainda assim a palatabilidade (DUGAN et al., 2015).

O Brasil encontra-se no quarto lugar no *ranking* de consumo da carne suína, consumindo no total cerca de 3,4 milhões de toneladas anuais, sendo que cada brasileiro consumiu em média 14,6 kg no ano de 2014 (ABPA, 2015; ABCS, 2015). A carne bovina continua sendo a mais consumida e a preferida de 48,7% dos brasileiros (SOUZA et al., 2013). O país que mais consome a carne suína é a China, totalizando pouco mais de 55 milhões de toneladas anuais. Em seguida encontram-se, a União Europeia com consumo de cerca de 20,1 milhões de toneladas anuais e os Estados Unidos, com 8,7 milhões de toneladas (BRAGA et al., 2013; ABCS, 2015).

Além de maior consumidor, a China também é a maior produtora de carne suína do mundo. Em 2014, a produção da carne suína na China foi de 57 milhões de toneladas, o que equivaleu a 50% da produção mundial. Neste mesmo ano, 27 países da União Europeia produziram 22,4 milhões de toneladas de carne suína, estando em segundo lugar no *ranking* mundial de produção. Em terceiro lugar, encontra-se os Estados Unidos, que produziu 10,4 milhões de toneladas e, em quarto lugar, o Brasil com produção de 3,34 milhões de toneladas (ABPA, 2015).

Em 2014, o rebanho brasileiro de suínos alcançou a marca de 2,1 milhões de matrizes, com destaque para a região sul que produziu cerca de 50% dos suínos do Brasil e abateu 69% dos animais produzidos no país (SEAB, 2013; ABPA, 2015). Contudo, a grande parte da produção de carne suína brasileira permanece no mercado interno e apenas 14% é destinada à exportação para vários países do

mundo, como a Europa, África, Ásia, Oceania e Américas do Norte, Central e do Sul (ABPA, 2015).

2.2. Sanidade Suína

Os suínos são facilmente sujeitos à condição de estresse fisiológico, que culmina em síndromes de múltiplas causas, conhecidas como doenças multifatoriais (BRUM et al., 2013). As doenças multifatoriais imunossupressoras são preocupantes, pois ocasionam elevada morbidade, mortalidade variável, suscetibilidade a patógenos e redução no desempenho metabólico, culminando em aumento no custo de produção (AGUILAR et al., 2015). Os animais doentes não se alimentam adequadamente, o que compromete o ganho de peso diário e aumenta a variação de peso dos suínos no abate (DEEN et al., 1998). Entretanto, a maioria das doenças disseminadas pelos plantéis pode ser evitada pela aplicação de boas práticas de manejo e biossegurança (BRUM et al., 2013).

Dentre as doenças multifatoriais, destacam-se as enfermidades causadas por vírus (VANNUCI; GUEDES, 2009), como a Peste Suína Clássica (PSC) e a circovirose, a principal doença infecciosa viral em suínos no Brasil (FREITAS et al., 2012; NOTTAR, 2007). O vírus da PSC, do gênero *Pestivirus*, tem importância mundial e infecta tanto suínos domésticos quanto selvagens. Esta enfermidade é altamente contagiosa e ocasiona grandes perdas econômicas na suinocultura, como altos índices de mortalidade e morbidade, e transtornos reprodutivos (FREITAS et al., 2012; BRAGA et al., 2013). A gravidade da doença depende da virulência dos isolados e resposta imune do suíno (PENRITH; VOSLOO; MATHER, 2010; BRAGA et al., 2013). Outros pestivírus, cujo hospedeiro principal não é o suíno, como o BVDV, de bovinos, e BDV (vírus da Doença das Fronteiras), de ovinos e caprinos (MÓSENA, 2014), podem vir a ocasionar infecções produtivas em suínos, tornando-os portadores e disseminadores dos vírus (WALZ et al., 2004; CABEZÓN et al., 2010).

Os pestivírus de ruminantes apresentam baixa infectividade em suínos, assim, na maioria dos casos, ao entrar em contato com BVDV, os suínos não apresentam sinais clínicos da infecção, tornando a disseminação viral entre os animais silenciosa (WALZ et al., 2004). A infecção por BVDV em leitões pode mimetizar vários sinais

clínicos da PSC e contribuir negativamente para a sua prevenção e controle (TAO et al., 2013). Sinais clínicos ocasionados por BVDV em animais imunossuprimidos podem ser confundidos com aqueles ocasionados pela PSC e conduzir a resultados equivocados do diagnóstico sorológico, devido à reatividade cruzada entre vírus (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2012; TAO et al., 2013; PATON; DONE, 1994; PAREDES et al., 1999).

A presença de BVDV em rebanhos de suínos foi relatada na Áustria, Alemanha, Irlanda, Noruega, Dinamarca, China e América do Norte, em proporções que variaram de 3 a 43% dos rebanhos (DENG et al., 2012; TAO et al., 2013). A suscetibilidade dos suínos ao pestivírus bovino denota a importância de estudos sobre a epidemiologia deste vírus. Além disso, faz-se primordial uma análise mais profunda dos impactos que os sinais clínicos da infecção por BVDV podem ocasionar na produção dos suínos (LIESS; MOENNIG, 1990; DENG et al., 2012).

2.3. Gênero *Pestivirus*

O gênero *Pestivirus*, pertencente a família *Flaviviridae*, inclui, além dos vírus da PSC, BVD e BD, outras possíveis novas espécies, tais como o *Giraffe* vírus, encontrado em girafa no Kenya (MÓSER, 2014); o *Hobi-like* vírus, isolado de um soro fetal bovino proveniente do Brasil (SCHIRRMIEIER et al., 2004); o *Pronghorn*, identificado em um antílope nos Estados Unidos (VILCEK; NETTLETON, 2006); e o *Bungowannah* vírus, isolado de suíno na Austrália (KIRKLAND et al., 2007). A diferenciação entre os diferentes pestivírus é difícil, pois pode haver reatividade cruzada nos testes sorológicos (MÓSENA, 2014).

Este gênero compreende vírus esféricos de 40 a 60 nm de diâmetro, que possuem nucleocapsídeo possivelmente icosaédrico revestido externamente por um envelope derivado das membranas da célula do hospedeiro (Figura 1) (WEBER, 2013; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). O genoma dos pestivírus é constituído por uma fita simples linear de RNA, com polaridade positiva, de 12,3 a 12,5 kb (WEBER, 2013; FLORES, 2007).

Os Pestivírus possuem duas regiões não traduzidas, uma na extremidade 5' e outra na 3' (WEBER, 2013), e uma única ORF (*Open Reading Frame*), contendo

aproximadamente quatro mil códons, que são traduzidos em uma única poliproteína. Posteriormente, esta poliproteína é clivada pelas enzimas da célula hospedeira e a medida que é traduzida passa a ser clivada por enzimas virais e celulares (FLORES, 2007; MÓSENA, 2014). As proteínas codificadas são as proteínas estruturais autoprotease N terminal ou proteína N (N^{pro}), proteína do capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E^{ms} , E1 e E2), proteína 7 (p7) e proteínas não estruturais (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Figura 1) (RIDPATH; FLORES, 2007; NEILL, 2013). As proteínas estruturais do vírus são codificadas pelo primeiro terço do genoma viral, enquanto que as proteínas não-estruturais são codificadas pelos dois últimos terços (POTGIETER, 2004).

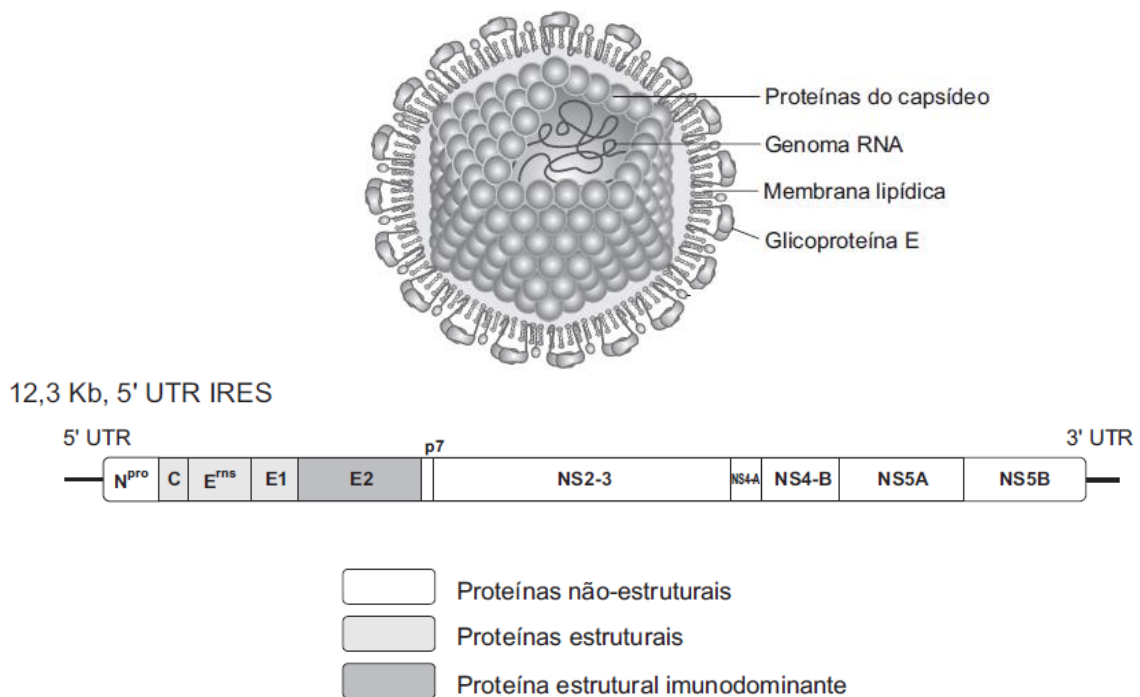


Figura 1. Imagem representativa da morfologia do vírus da família *Flaviviridae* e esquema ilustrativo da estrutura do genoma do gênero *Pestivirus*.
Fonte: Virologia (Flores, 2007)

O capsídeo do vírus é formado pela proteína C, que envolve o RNA viral (FLORES, 2007; NEILL, 2013). Necessárias para a infectividade dos vírions, as proteínas E1 e E2 são encontradas no envelope viral. A proteína E2 é responsável

pela interação com os receptores celulares do vírion e entrada na célula hospedeira, tornando-se alvo de grande parte dos anticorpos neutralizantes (WANG; LI; MODIS, 2014).

Das proteínas não estruturais, a N terminal (N^{pro}), possui atividade autoproteolítica e é responsável pela primeira clivagem da poliproteína. A N^{pro} é somente encontrada nos pestivírus, sendo a região de escolha para análises laboratoriais comparativas de isolados (FLORES, 2007). A primeira proteína estrutural clivada da poliproteína é a p7, que possivelmente possui função na formação de canais iônicos na membrana da célula infectada, facilitando, assim, a movimentação do vírus entre as células (NEILL, 2013; MÓSER, 2014).

A NS2/3 está presente em cepas não-citopáticas de BVDV e é necessária na replicação viral inicial durante a infecção. A NS3 representa a parte C-terminal da proteína NS2. As células infectadas com o vírus citopático sofrem uma expressão exacerbada da proteína NS3 devido a mutações na NS2, gerando a NS2 e a NS3 individuais (WEBER, 2013). A proteína NS4A atua como cofator da proteína NS3 para exercer sua atividade de clivagem. A proteína NS4B torna-se parte da membrana do complexo de Golgi, sendo associada ao complexo de replicação do RNA e rearranjos da membrana celular das células infectadas (MENDEZ, 1998). Já as proteínas NS5A e NS5B estão codificadas no final da poliproteína. A função da NS5A não está bem esclarecida, mas sabe-se que esta proteína encontra-se junto à proteína NS4B no complexo de replicação do RNA. A proteína NS5B atua como RNA-polimerase, sendo a principal proteína na replicação do RNA genômico (MENDEZ, 1998; WEISKIRCHER et al., 2009).

A replicação do genoma e a produção da progênie viral ocorrem inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). A penetração do vírus se dá por endocitose após a interação das proteínas do envelope viral com os receptores CD46 da membrana plasmática (MAURER et al., 2004), ocorre a fusão do envelope com a membrana endossomal após acidificação dos endossomos, então, o capsídeo dissocia-se e o genoma é liberado no citoplasma (FLORES, 2007; MÓSENA, 2014). A síntese de uma molécula de RNA é realizada no sentido antígenômico de polaridade negativa, que serve de molde para a síntese dos

RNAs de polaridade positiva, as quais funcionam como RNAm e posteriormente são encapsuladas como genoma da progênie viral (POTGIETER, 2004; FLORES, 2007).

As proteínas estruturais são responsáveis pela montagem e construção da progênie viral. Na região perinuclear, associada ao complexo de Golgi e ao retículo endoplasmático liso, ocorre a morfogênese de novas partículas virais, que uma vez presentes em vesículas no citoplasma são posteriormente liberadas (FLORES, 2007; WANG; LI; MODIS, 2014).

Os pestivírus possuem envelope rico em lipídios e, portanto, são vulneráveis a muitos desinfetantes comuns, como detergentes e solventes. Contudo os pestivírus resistem à inativação em pH baixo e apresentam certa estabilidade em uma ampla faixa de pH (FLORES, 2007; MÓSENA, 2014).

2.4. Vírus da Diarreia Viral Bovina

O BVDV é um importante agente patogênico dos bovinos, mas pode infectar outros ruminantes e suínos (SAMARA; DIAS; MOREIRA, 2004). As perdas econômicas resultantes de infecções por BVDV são caracterizadas por falhas na fertilização, abortos, malformação congênita, natimortos ou o nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (FLORES et al., 2000). O BVDV foi primeiramente associado a um surto de diarreia aquosa sanguinolenta em bovinos em 1946, no Canadá (CHILDS, 1946). Neste mesmo ano, nos Estados Unidos, pesquisadores também associaram o BVDV a sinais respiratórios, leucopenia, queda na produção de leite e aumento nas taxas de abortos em bovinos (OLAFSON; MACCALLUM; FOX, 1946).

No final dos anos 50, em Iowa, Estados Unidos, uma forma especial do BVDV foi relatada. Os pesquisadores observaram sinais clínicos de hemorragia e erosões intestinais em bovinos, os quais não puderam ser reproduzidos experimentalmente. Assim, concluiu-se que se tratava de uma doença diferente da causada pelo BVDV, nomeada de Doença das Mucosas (DM) (CORAPI; DONIS; DUBOVI, 1989). Já no Brasil, no estado de São Paulo, em 1968, foi relatada uma doença gastroentérica em bovinos, com aspectos clínicos e patológicos compatíveis com a DM (CORREA; NETTO; BARROS, 1968). No entanto, foi somente em 1974 que Vidor e

colaboradores (1974) conseguiram isolar o agente etiológico do BVD do sangue de um feto em um matadouro no Rio Grande do Sul.

Existem dois biótipos de BVDV, classificados com base no efeito da replicação em células de cultivo: não-citopatogênico (ncp) e citopatogênico (cp). A maioria dos BVDVs isolados de campo são ncp e, portanto, não afetam a integridade das células em cultura (WEBER, 2013). Este biótipo é economicamente mais importante, pois estes vírus são capazes de atravessar a barreira placentária e produzir animais PI (DEREGT; LOEWEN, 1995).

Já os biótipos cp são originados de mutações, deleções e rearranjos genéticos na proteína viral não-estrutural NS2/3 (WEBER, 2013). A Doença das Mucosas em bezerros é causada por essa alteração e, em sua forma mais grave, causa uma enfermidade gastroentérica fatal (DEREGT; LOEWEN, 1995).

O BVDV foi subdividido em duas espécies, o BVDV do tipo 1, encontrado na maioria das cepas vacinais e, o BVDV do tipo 2, descoberto em uma enfermidade severa na década de 1980 (ICTV). BVDV-1 são responsáveis por infecções de caráter brando a moderado e são descritas como amostras clássicas do vírus ou estirpes de referência (FLORES et al., 2000). Já o BVDV-2 ocasiona altos índices de morbidade e mortalidade em bovinos, gerando quadros de aborto, doença respiratória ou entérica aguda, doença hemorrágica e trombocitopenia (BRUM et al., 2013). Este genótipo é isolado de infecções subclínicas, de animais PI ou como contaminantes de soro fetal bovino em vacinas, e é caracterizado por sinais clínicos de virulência baixa ou moderada (FLORES et al., 2000; BRUM et al., 2013).

A transmissão do BVDV ocorre tanto pelo contato direto entre os bovinos quanto por contato indireto, como fômites, medicamentos ou vacinas contaminadas. Em fêmeas prenhes, o vírus pode ser transmitido para os fetos através da barreira transplacentária (WEBER, 2013). A porta de entrada do vírus ocorre pela mucosa oral ou nasal, pela inalação ou ingestão de secreções e/ou excreções contaminadas (SAMARA; DIAS; MOREIRA, 2004). As tonsilas, os tecidos linfóides e o epitélio da orofaringe são os sítios iniciais de replicação e a disseminação pelo organismo ocorre por meio das células linfóides presentes na corrente circulatória (SILVA et al., 2011).

Clinicamente, a infecção aguda por BVDV em bovinos pode ocasionar desde sinais subclínicos até a morte do hospedeiro. Os animais podem apresentar sinais

clínicos como piréxia, diarreia intermitente, descarga nasal e ocular, depressão e ligeira tosse seca. Sob grave infecção é possível observar trombocitopenia, febre alta, hemorragia e mortalidade alta (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). A soroconversão pelos bovinos ocorre entre 14 e 28 dias após a infecção, e os anticorpos podem ser detectados até 3 anos após a ocorrência do quadro clínico (CHASE, 2013).

A infecção aguda em vacas e novilhas no período de reprodução ou durante a gestação pode causar efeitos deletérios na concepção, na sobrevivência embrionária e no desenvolvimento fetal, dependendo do estágio reprodutivo ou gestacional da fêmea (RIDPATH; FLORES, 2007). Por exemplo, o contato da fêmea com o BVDV no primeiro mês de gestação pode resultar primariamente em baixas taxas de concepção e em intervalos prolongados entre partos (BRUM et al., 2013). Entre o 2º e o 4º mês de gestação, a infecção por BVDV resulta em deformidades no sistema nervoso central e sistema ocular do feto, que pode apresentar hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, degeneração ocular, artrogripose, braquignatismo e retardo no crescimento intrauterino (RIDPATH; FLORES, 2007).

A formação de bezerras PI pode ocorrer quando a fêmea entra em contato com o vírus entre 45º e 120º dias de gestação (ARENHART, 2008). Esses animais não apresentam sinais clínicos de infecção e replicam o vírus continuamente, o que os torna os principais reservatórios de BVDV em um rebanho (DEREGT; LOEWEN, 1995). Após o quinto mês de gestação, a infecção por BVDV das fêmeas resulta em fetos imunocompetentes ao vírus e soropositivos, os quais podem nascer saudáveis e normais (RIDPATH; FLORES, 2007).

Nos suínos, a infecção por BVDV possui patogenia semelhante àquela que ocorre em bovinos, principalmente em relação às fêmeas infectadas na fase gestacional (BAKER, 1987). A infecção por BVDV em suínos provoca o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes que podem impedir a disseminação do vírus pelo organismo (WALZ et al., 1999). Assim, a infecção subclínica ocorre em cerca de 70 a 90% dos casos, embora, em animais imunossuprimidos, a infecção por BVDV possa levar à óbito (DENG et al., 2012). A falta de sinais clínicos da infecção contribui para a disseminação silenciosa do vírus no rebanho, fazendo com que o suíno se torne uma fonte de infecção, inclusive para bovinos (TAO et al., 2013).

As infecções por BVDV em suínos ocorrem em condições naturais e com certa frequência, especialmente em fazendas com criação de gado muito próximas (WIERINGA-JELSMA; QUAK; LOEFFEN, 2006; MÓSENA, 2014). Suínos que tiveram contato com bovinos recentemente vacinados com BVDV estão expostos à infecção (STEWART et al., 1971), assim como suínos, que mesmos mantidos em lotes e edifícios separados de bovinos, compartilham mesmo pessoal e equipamentos na sua produção (CARBREY et al., 1976; PATON; DONE, 1994). Também, a alimentação dos suínos com soro de leite ou leite de vaca, prática comum em unidades que produzem tanto gado leiteiro quanto suínos, constitui uma importante fonte de infecção de BVDV (TERPSTRA; WENSVOORT, 1988). A detecção de BVDV em amostras de urina, sêmen e fluido oronasal de suínos são indicativos de que tais fluídos também constituem importantes fontes de infecção a outros animais (TERPSTRA; WENSVOORT, 1997).

Os sinais clínicos descritos em surtos ocasionados por BVDV em suínos foram anemia, pelagem áspera, retardo no crescimento, tremores, conjuntivite, diarreia, poliartrite, petéquias na pele e cianose de orelha (TERPSTRA; WENSVOORT, 1988). Em fêmeas gestantes, a infecção pode provocar morte embrionária, múltiplos defeitos congênitos, abortos ou o nascimento de animais PI (TERPSTRA; WENSVOORT, 1997). Enfermidade gastroentérica ou respiratória, doença hemorrágica, perdas reprodutivas devido à infertilidade temporária, mumificações fetais, malformações, natimortos ou nascimento de animais fracos e inviáveis também são consequências da infecção pelo BVDV em suínos (RIDPATH; FLORES, 2007; O'SULLIVAN et al., 2011). Os sinais clínicos relatados após infecção de suínos com vacinas contra a PSC contaminadas por BVDV foram anemia, diarreia e hipertermia (MÓSENA, 2014). Também, síndromes de doenças caracterizadas pelo atraso no crescimento e perda de massa foram relatadas em suínos infectados com o BVDV (LANGOHR et al., 2012). Infecções pós-natais em suínos por BVDV geralmente passam despercebidas, embora a temperatura ligeiramente elevada, leucopenia leve, redução do apetite e diarreia possam ser observados (TERPSTRA; WENSVOORT, 1997).

Como objetivos deste trabalho foi induzida a infecção experimental e avaliação da possibilidade de transmissão pela via aerógena do BVDV entre leitões desmamados. Verificou-se, usando modelo e metodologia experimental, se houve ou

não transmissão pela via aerógena entre leitões desmamados infectados com o BVDV tipo 1 e também a avaliou-se a patogenicidade do BVDV nos leitões.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos de inoculação experimental em leitões, em setembro de 2014 e em abril de 2015. O primeiro experimento foi conduzido por 18 dias e o outro por 25 dias, período no qual foram realizadas coletas de sangue, e suabes nasais e retais. Os leitões foram distribuídos aleatoriamente em duplas nas três câmaras de isolamento que corresponderam aos grupos controle, infectado e sentinela (Figura 2). Na primeira câmara de isolamento, os animais controle serviram como validação dos experimentos, e na terceira câmara, os animais sentinela serviram como verificação da transmissão viral por via aerógena. Previamente à entrada dos animais, os depósitos de suprimentos foram preenchidos com água e ração esterilizados, visando diminuir a possibilidade de contaminação dos isoladores.

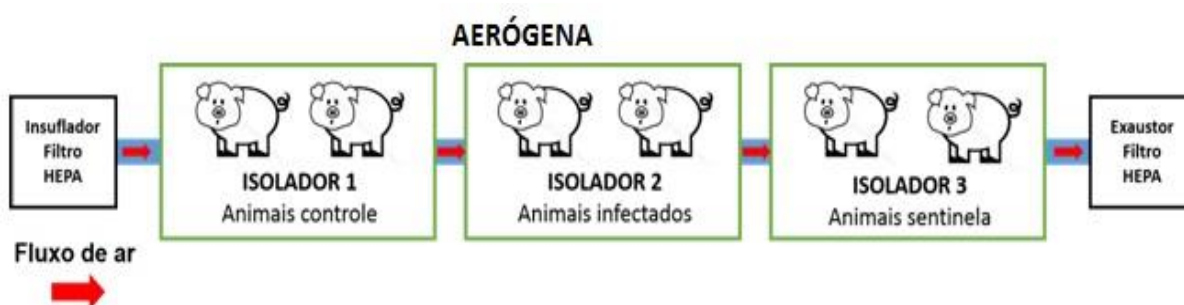


Figura 2. Representação esquematizada do fluxo de ar utilizado no bioensaio experimental de infecção do vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 1, em leitões desmamados, e verificação da transmissão viral por via aerógena.

3.2 Descrição dos isoladores e entrada dos leitões

Foram utilizados isoladores de aço inoxidável (0,80m x 0,80m x 1,30m), completamente fechados e especialmente projetados para estudos epidemiológicos (Figura 3 e 4), cujo modelo é referente ao protótipo desenvolvido por Torremorell e colaboradores (1997). As câmaras suportam a presença de dois leitões até atingirem o peso de 10 kg cada, por no máximo 30 dias.



Figura 3. Modelo do isolador: (1) entrada de ar do sistema, (2) saída de ar, (3) reservatório de água, (4) luvas de borracha para manipulação interna, (5) orifício para conexão com outro isolador (contato naso-nasal), (6) saco para a coleta de dejetos, e (7) caixa de passagem, dotada de portas interna e externa.



Figura 4. Imagem fotográfica ilustrando a disposição dos isoladores para avaliação da transmissão aerógena. Jaboticabal, SP, 2015.

O sistema de isoladores possui uma câmara de passagem com portas interna e externa que possibilitam o acesso dos materiais de coleta para o interior dos isoladores. Para a manipulação dos animais utilizam-se luvas de canos longos e emborrachados adaptadas às paredes laterais do equipamento. Pisos plásticos fenestrados favorecem a drenagem de excreções para o piso inferior de aço inoxidável e de formato cônico, conduzindo as fezes e a urina dos animais para sacos plásticos presos na parte inferior do isolador. Os isoladores contêm depósitos para ração e água com tampas herméticas, permitindo o abastecimento sem a necessidade de abertura do sistema.

A ventilação é realizada por dutos estéreis (0,20m de diâmetro) que conectam os isoladores com as unidades ventiladoras e exaustoras em suas extremidades de entrada e saída. Ambas as unidades, a exaustora (Exaustflow500, Filtracom Ltda, Campinas, SP) e a ventiladora (Sterilflow500, Filtracom Ltda) foram equipadas com pré-filtros e filtros absolutos tipo HEPA, com 99,97% de eficiência para partículas de até 0,3 μm . A taxa de ventilação utilizada foi ajustada para 550 m^3/h (aproximadamente $1\text{m}^3/\text{leitão}/\text{min}$), induzindo uma pressão positiva no interior das câmaras. O sistema foi ligado a um gerador para evitar o desligamento em caso de queda de energia.

3.3. Seleção dos Animais

Para cada um dos dois experimentos realizados, foram utilizados seis leitões desmamados de linhagem comercial, com cerca de 21 dias de idade, apresentando bom escore corporal, provenientes da mesma leitegada, do setor de Suinocultura, FCAV/UNESP. Antes da seleção dos animais, a temperatura da matriz doadora e dos leitões foi mensurada e foi realizada avaliação clínica dos animais. Além disso, confirmou-se a ausência de anticorpos contra o BVDV por virusneutralização (VN).

Os leitões permaneceram em observação por sete dias em baias próprias para infecção experimental no Laboratório de Pesquisas em Suínos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP. Neste período, no primeiro, quarto e sétimo dias, foram coletadas amostras de sangue e suabes retais e nasais, as quais foram analisadas quanto à presença do RNA do BVDV por

virusneutralização (VN) e RT-PCR. A mensuração da temperatura dos animais foi realizada diariamente, assim como a observação diária de possíveis sinais clínicos. Os animais foram identificados aleatoriamente com brincos, alimentados duas vezes ao dia com ração de manutenção contendo milho e soja triturados, e água foi fornecida à vontade.

3.4. Inóculo

Imediatamente após a entrada dos leitões nas câmaras de isolamento, o grupo alojado no isolador 2 recebeu a suspensão viral de BVDV do tipo 1 citopatogênico, gênero *Pestivirus*, estirpe Singer. O inóculo foi produzido no Laboratório de Viroses da Reprodução, FCAV/UNESP. As doses infectantes de BVDV em culturas de tecidos (TCID₅₀) de células epiteliais de rim bovino da linhagem permanente “Madin Darby bovine kidney” (MDBK) foram de 10^{5,5} TCID₅₀. A diferenciação do número de doses infectantes foi realizado conforme recomendam e pelo método proposto por Reed e Muench (1938).

A inoculação de BVDV nos leitões do grupo infectado, seguiu o método preconizado por Cabezón e colaboradores (2010). Os leitões foram inoculados via intranasal, pela instilação de 2,5 mL de suspensão viral em cada narina, e por via oral, pela administração de 5,0 mL da suspensão viral. Nos animais controle e sentinela, foi administrada uma solução fisiológica livre de vírus, na mesma quantidade do inóculo.

3.5. Coleta de amostras

As coletas de amostras durante os experimentos, seguiram um cronograma pré-determinado. Antes de cada coleta foi realizado exame clínico geral de cada leitão, com mensuração de temperatura retal e avaliação de sinais clínicos.

As coletas de sangue foram realizadas a cada quatro dias e com uso de tubos tipo Vacutainer® ou seringa estéril descartável, livres de anticoagulantes. As amostras de sangue foram obtidas a partir da punção da veia jugular (Figura 5), centrifugadas a 9000 x g por 10 minutos para obtenção de soro sanguíneo, o qual foi acondicionado em

tubos de 2,0 mL e armazenado em freezer -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

Os suabes nasais e retais foram coletados diariamente e armazenados em tubos estéreis de 2,0 mL, livres de DNase e RNase, contendo 0,3 mL de EMEM, suplementado com antibióticos. Os suabes para coleta de secreções nasais foram introduzidos em ambas as narinas de forma a coletar os fluidos mais profundos. As excreções retais também foram coletadas com o auxílio de suabes (Figura 5). Após as coletas, os tubos contendo os suabes, foram imediatamente congelados por nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer -80°C até a realização das análises.

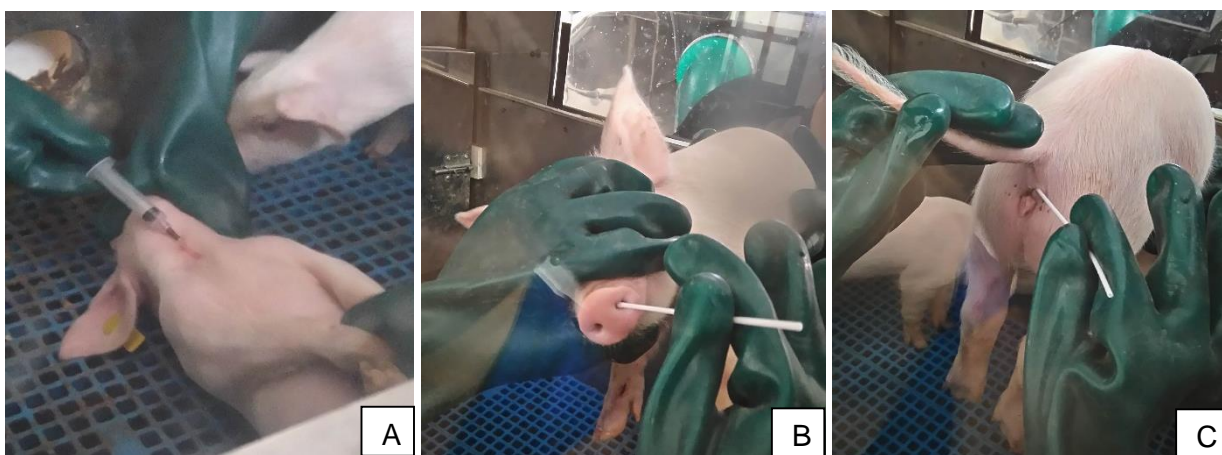


Figura 5. (A) Imagem fotográfica ilustrando a coleta de sangue pela punção da veia jugular; (B) coleta de secreção nasal; e (C) coleta de excreção retal com suabes estéreis, no interior dos isoladores. Jaboticabal, SP, 2015.

3.6. Necropsia

No último dia dos experimentos, os seis animais foram eutanasiados e necropsiados. Na sala de necropsia, a bancada e a talha, para disposição dos animais, foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 1%. Na noite anterior os leitões não foram alimentados, evitando assim o rompimento das alças intestinais por acúmulo de alimento. Após o desligamento dos isoladores e abertura do sistema, os animais foram sedados com 15 mL/Kg de Cetamina 10% + 0,5 mg/Kg de Midazolam e, posteriormente,

eutanasiados por sangria pela incisão nos grandes vasos do pescoço (veia jugular e artéria carótida), com o animal em posição horizontal. Na necropsia observou-se a presença ou ausência de lesões macroscópicas, evitando o rompimento ou corte dos órgãos.

Os materiais utilizados, tais como facas, pinças, tesouras e cabos de bisturi foram limpos com sabão detergente Alconox® 1% e enxaguados em água ultrapura. Todo o material foi autoclavado por 20 minutos a 121°C, e posteriormente, submetido por duas horas a uma temperatura de 180°C, visando a degradação das enzimas presentes na superfície. Os materiais recém utilizados na necropsia foram imediatamente esterilizados com água fervente.

Os órgãos coletados para análise foram baço, intestino (porção de íleo), linfonodos mesentéricos, linfonodos mediastínicos, linfonodos inguinais, pulmão, rim, fígado e tonsilas, orientando a coleta dos fragmentos em regiões apresentando lesões macroscópicas. Os fragmentos de tecidos foram acondicionados em tubos de 2,0 mL, livres de DNases e RNases, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer -80°C até a realização das análises.

A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (número de referência 07998/14, 8 de maio de 2014).

3.7. Técnica de virusneutralização (VN)

3.7.1 Manutenção das culturas celulares

Células de linhagem permanente MDBK foram utilizadas para a realização do teste de VN e multiplicação da estirpe do BVDV. As monocamadas celulares foram mantidas em garrafas de poliestireno de 75 cm² (TPP®, Suíça), contendo meio de manutenção “Minimum Essential Medium” (Eagle-MEM) Gibco® (Invitrogen™, Estados Unidos), filtrado, sem adição de antibióticos, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio, mantido em pH 7 e enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®, Brasil). A cada 48 horas o processo de replicação celular foi repetido,

o qual constituiu-se pelo descarte do meio de manutenção, lavagem dupla do tapete celular com tripsina-versene (DifcoTM, Estados Unidos) a 0,2% aquecida e, na terceira vez, a tripsina foi mantida sobre a monocamada por 5 minutos, visando causar a individualização e o desprendimento das células. Após esse período, a tripsina foi desprezada, as garrafas batidas e as células ressuspendidas em certa quantidade de meio Eagle-MEM para contagem em câmaras de Neubauer, utilizando azul de Tripán como corante. Depois de realizada a contagem e os cálculos de rendimento da suspensão celular, para as reações de VN preparou-se uma suspensão com 3×10^5 células/mL, e para outros subcultivos, 2×10^5 células/mL, os quais receberam meio de manutenção. As garrafas com os subcultivos foram colocadas em estufa a temperatura de 37°C para formação de novas monocamadas celulares.

3.7.2. Propagação viral em cultivo celular

Para formação de estoque viral e uso na VN, a amostra de vírus de BVDV estirpe Singer foi multiplicada sucessivamente em células MDBK. A amplificação do BVDV foi realizada em monocamada celular preparada com 24 horas de antecedência, na concentração de 2×10^5 células/mL, em frascos de poliestireno de 25 cm² e 75 cm². Assim, após desprezado o meio de manutenção, 1 mL do vírus foi depositado dentro da garrafa e esta foi incubada em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO₂ a temperatura de 37°C, durante um período de 60 minutos, para adsorção das partículas virais às células. Transcorrido esse tempo, foram adicionados à garrafa 9 mL de meio de manutenção, a qual foi novamente colocada em incubação temperatura de 37°C. A garrafa foi observada diariamente para visualização da formação de sincícios em microscópio invertido (Coleman, Brasil). Quando os sincícios ocuparam aproximadamente 80% da monocamada celular, período que variava de 5 a 7 dias, a garrafa foi congelada a -80°C e descongelada rapidamente a 37°C para ocasionar o rompimento das células e liberação das partículas virais. Posteriormente, este material foi submetido à centrifugação refrigerada a 5.000 x g por 15 minutos para decantação dos restos celulares. O sobrenadante contendo o vírus foi separado, distribuído em criotubos em alíquotas de 1 mL, e armazenado em botijões contendo nitrogênio líquido a -196°C.

3.7.3. Determinação do título infectante viral

Depois de realizada a amplificação viral, uma ampola do vírus armazenada em nitrogênio líquido foi titulada para uso no teste de VN. Inicialmente, após descongelamento do criotubo a 37°C, 500 µL de vírus foram adicionados a 4,5 mL de meio Eagle-MEM em tubo de ensaio imerso em gelo, para diluição seriada do vírus na base 10 (10⁻¹ a 10⁻⁸). Após, 50 µL das diluições do vírus foram distribuídos em uma microplaca descartável de poliestireno com 96 cavidades (TPP®, Suíça), ocupando 64 cavidades (colunas 1 a 8), começando a distribuição da última (10⁻⁸) para a primeira diluição (10⁻¹), onde anteriormente haviam sido adicionados 50 µL de meio Eagle-MEM. Por último, foram adicionados 50 µL de suspensão de células MDBK em uma concentração de 3 x 10⁵ células/mL. As duas últimas colunas da placa (colunas 11 e 12) foram utilizadas para controle celular contendo 50 µL de suspensão de células e 100 µL de meio Eagle-MEM por cavidade. A placa foi então mantida sob a temperatura de 37°C em incubadora com atmosfera controlada de 5% de CO₂, por 96 horas. A leitura do resultado foi feita pela visualização da formação de sincícios em microscópio invertido. O cálculo do título infeccioso do vírus, capaz de determinar 50% de destruição na cultura de células (TCID_{50%}), foi realizado pelo método de Reed e Muench (1938).

3.7.4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes

Os soros armazenados em freezer a -20°C foram descongelados em temperatura ambiente e colocados em banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento. Ao mesmo tempo, na primeira coluna de uma microplaca de 96 cavidades, foram adicionados 100 µL de meio Eagle-MEM acrescido de 1% de uma solução de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL) (Cultilab®, Brasil), e 50 µL nas colunas de 2 a 12, excetuando a coluna 3. Depois de inativados, foram adicionados 50 µL de soro nas colunas 2 e 3. A partir da coluna 3 (diluição 1:2), foi feita a diluição seriada de razão 2 do soro até a coluna 12 (diluição 1:1024), e após a diluição, 50 µL de suspensão viral de BVDV, ajustados a uma concentração de 200 TCID₅₀, foram adicionados a essas cavidades. A microplaca foi

incubada por 60 minutos em estufa com tensão controlada de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, foram acrescentados às cavidades da microplaca 50 µL de uma suspensão de células MDBK, na concentração de 3×10^5 células/mL. Esta era novamente incubada nas mesmas condições por um período de 96 horas. Transcorrido esse tempo, a leitura da microplaca foi realizada em microscópio invertido, verificando-se primeiro as cavidades do controle da suspensão celular e do controle de toxicidade do soro teste (colunas 1 e 2), para em seguida verificar a presença ou ausência da formação de sincícios nas outras cavidades. Considerou-se reagente a amostra de soro que promoveu neutralização total de 200 TCID₅₀ do BVDV a partir da diluição 1:2. Amostras de cada animal foram testadas em duplicata na mesma microplaca, e o título, expresso como o inverso da diluição em que foi verificada a neutralização viral, foi calculado por meio de média geométrica.

3.7.5. Controle das TCID₅₀

Para todos os testes de VN realizados foi preparada uma microplaca de retrotitulação e controle de TCID₅₀. Como para o BVDV o intervalo de variação aceito é de 20 a 100 TCID₅₀, utilizava-se a mesma diluição que definiu as 100 TCID₅₀ na microplaca de validação do teste e, a partir desta, eram obtidas diluições de 20 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀ e 0,2 TCID₅₀. Assim, em uma microplaca de 96 cavidades já adicionadas de 50 µL de meio Eagle-MEM, 50 µL das diluições das doses infectantes eram adicionadas por cavidade às quatro primeiras colunas, sendo 0,2 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀, 20 TCID₅₀ e 200 TCID₅₀, respectivamente. Da sexta à nona coluna foi feito o controle do título viral da mesma forma descrita anteriormente. Desta forma, a partir do conhecimento do título utilizado no teste, foram preenchidas as cavidades (50 µL) com diluições próximas àquelas do título viral. A quinta e a décima colunas permaneceram vazias e as duas últimas foram destinadas ao controle da suspensão celular. Após incubação em estufa a 37°C com tensão controlada de 5% de CO₂ por 60 minutos, foram adicionados a todas as cavidades 50 µL de suspensão celular contendo 3×10^5 células/mL. Por fim, essa placa foi incubada junto com as demais, descritas anteriormente, por 96 horas, e sua leitura foi realizada anteriormente a esta, pois os resultados nela encontrados validaram ou não o teste realizado.

3.8. Detecção do BVDV por RT-PCR

Os procedimentos para extração do RNA viral, RT-PCR e PCR de identificação do RNA viral, foram realizados no Laboratório de Epidemiologia Molecular, localizado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/UNESP.

3.8.1. Extração de RNA

Para a extração do RNA viral, utilizou-se o reagente TRIzol® (Invitrogen™, Estados Unidos). As amostras de suabe nasal e retal foram descongeladas em temperatura ambiente por 30 minutos. Após, os suabes foram drenados e retirados do meio de cultivo EMEM para possibilitar a transferência de uma alíquota do meio contendo as secreções e excreções para outro tubo. Assim, foram transferidos 250 µL do meio de cultivo para um tubo eppendorf de 2,0 mL contendo 750 µL de TRIzol®. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e permaneceram em temperatura ambiente por 7 minutos. Transcorrido esse período, foram adicionados 200 µL de clorofórmio à solução que foi agitada vigorosamente em vórtex por 30 segundos. Após, os tubos foram centrifugados a 13.400 x g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante translúcido foi transferido para outro tubo ao qual foram adicionados 700 µl de isopropanol, sendo a solução mantida em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período de precipitação do RNA, procedeu-se a centrifugação dos tubos a 13.400 x g por 15 minutos a 4°C. A fase líquida foi descartada e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL de álcool etílico 75% (v/v). Procedeu-se a centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. A fase líquida foi novamente descartada e o pellet foi seco em estufa a 50°C por 15 minutos. Após, o pellet de RNA foi ressuspendido em 20 µl de água livre de RNases. Uma alíquota do RNA foi imediatamente submetida à RT-PCR e o restante foi armazenado em freezer -80°C. Como controle positivo, o padrão de BVDV Singer citopático foi extraído juntamente com as amostras em cada processo de extração.

3.8.2. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o “kit” High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Estados Unidos), segundo a metodologia recomendada pelo fabricante. A reação de transcrição constituiu-se de 2 µL de tampão 10X, 0,8 µL de dNTP Mix (100 mM), 2 µL de iniciadores randômicos, 1 µL da Enzima MultiScribe™ Transcriptase Reversa, 4,2 µL de água livre de RNAses e 10 µL de RNA, totalizando 20 µL. O cDNA foi sintetizado em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para 10 minutos à temperatura de 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. Terminado o ciclo, o cDNA foi armazenado em freezer -20°C.

3.8.3. PCR

Para a detecção do produto amplificado do gene 5'-UTR dos genes por meio da PCR, foram empregados “primers” que se ligam à região altamente conservada do genoma do BVDV localizada na extremidade 5' não-traduzida da estirpe NADL que compartilha máxima homologia com os genótipos de BVDV tipo 1 e 2. Desta forma, utilizou-se um par de iniciadores, denominados 103 (5'- TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC - 3') e 392 (5'- ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC - 3') que amplificam um fragmento de 290 pb (WEINSTOCK et al., 2001).

Para a primeira reação de PCR utilizou-se tampão 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1,0 U Taq DNA polimerase, 5 pmol de cada primer, 5 µL de cDNA e água para 20 µL. A amplificação dos fragmentos ocorreu em termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos, seguido de um ciclo final de 72°C por sete minutos.

O produto da primeira PCR foi utilizado no lugar do cDNA para a realização da segunda PCR, que ocorreu sob as mesmas condições da PCR 1, utilizando-se o mesmo par de iniciadores. Em todas as reações foram utilizados controles positivos, contendo material genético do BVDV controle, e negativos, com ausência de material genético. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de

agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídeo (0,5 mg/mL), e visualizados em equipamento de fotodocumentação GelDocXR (BioRad, Estados Unidos).

4. RESULTADOS

No primeiro experimento, houve soroconversão pelos leitões do grupo infectado no 16º dia após inoculação (DAI), cuja presença de anticorpos foi detectada em um dos leitões, sendo mantida nos leitões inoculados até o 18º DAI. Os leitões do grupo controle e sentinela não apresentaram soroconversão.

Embora a soroconversão tenha sido detectada no 16º DAI, a excreção do vírus por via nasal foi detectada por RT-PCR somente no 17º DAI em apenas um dos leitões infectados, a qual não persistiu no 18º DAI (Figura 6). Nas amostras de tecidos do fígado, baço e rim do animal infectado, que apresentou excreção viral, também foi detectada a presença do RNA viral por RT-PCR (Figura 7 e 8).

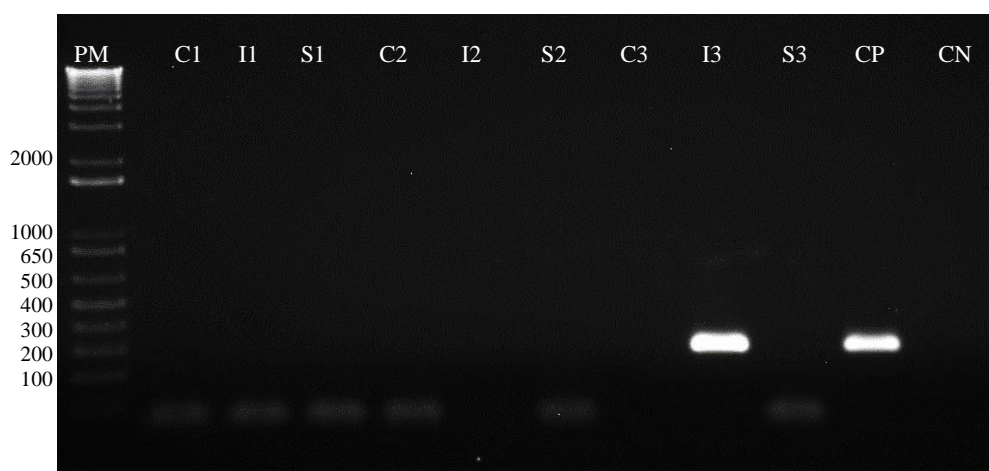


Figura 6. Produto de PCR indicando a presença do BVDV na amostra de suabe nasal do animal infectado no primeiro experimento. C1, 2 e 3: animais controle; I1, 2 e 3: animais infectados; S1, 2 e 3: animais sentinela. 1: 15º DAI; 2: 16º DAI; 3: 17º DAI. PM: padrão de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP: controle positivo da reação (BVDV-1, Singer). CN: controle negativo (*mix* sem DNA).

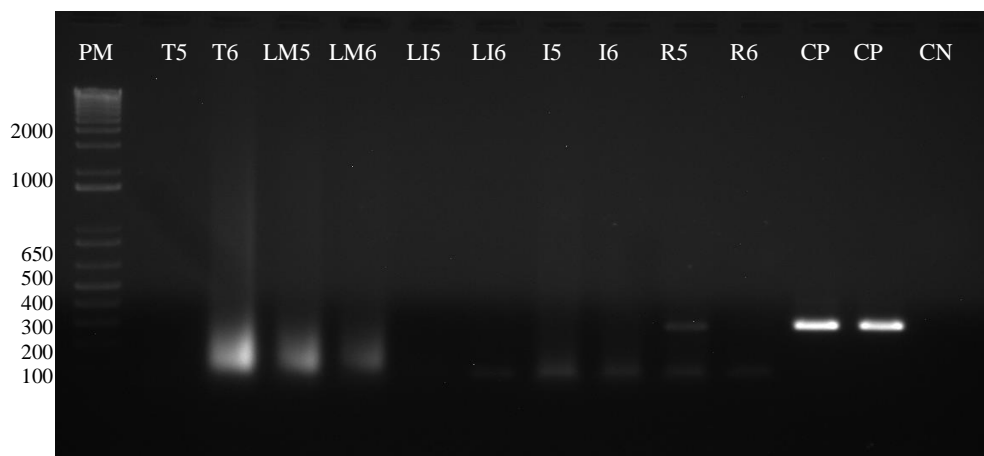


Figura 7. Produto de PCR indicando a presença do BVDV no rim de um dos animais infectados no primeiro experimento. 5 e 6 animais do grupo infectados. T5 e T6: tonsila; LM5 e LM6: linfonodo mesentérico; LI5 e LI6: linfonodo inguinal; I5 e I6: íleo; R5 e R6: rim. PM: padrão de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP: controle positivo da reação (BVDV-1, Singer). CN: controle negativo (*mix* sem DNA).

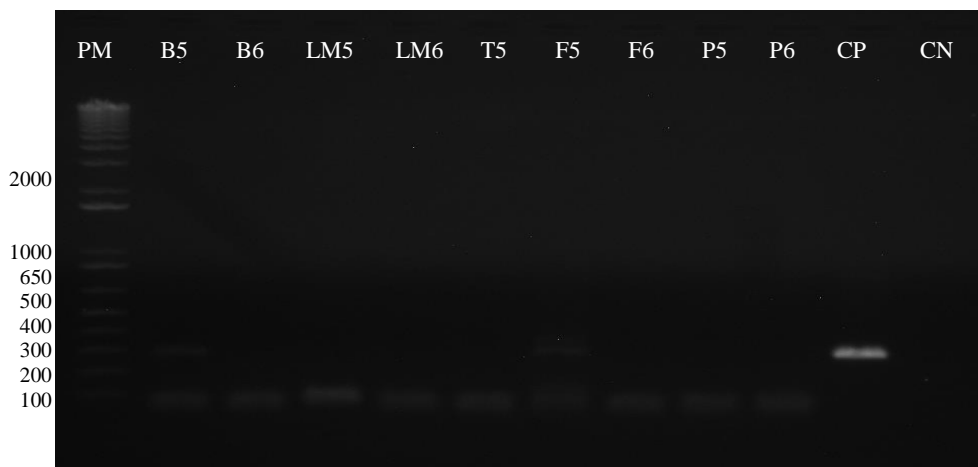


Figura 8. Produto de PCR indicando a presença de RNA viral no baço e fígado de um dos animais infectados no primeiro experimento. 5 e 6 animais do grupo infectados. B5 e B6: baço; LM5 e LM6: linfonodo mediastínico; T5: tonsila; F5 e F6: fígado; P5 e P6: pulmão. PM: padrão de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP: controle positivo da reação (BVDV-1, Singer). CN: controle negativo (*mix* sem DNA).

Neste período, os leitões do grupo infectado apresentaram quadros diarreicos após cerca de quatro DAI, que persistiram por cinco dias (Figura 9). Também, durante as coletas de sangue, observou-se nos animais infectados um retardo no tempo de coagulação nas quatro últimas coletas.



Figura 9. (A) Imagem fotográfica ilustrando leitão do grupo inoculado apresentando diarreia e, (B) parede do isolador do grupo inoculado com resíduos de fezes resultantes dos quadros diarreicos dos leitões infectados. Jaboticabal, SP, 2015.

Na necropsia dos leitões do primeiro experimento, observou-se nos animais inoculados casos de hidroperitônio. Ao expor as alças intestinais, os vasos mesentéricos apresentavam-se congestionados. No rim, observou-se lesões em sua parede externa (Figura 10). Os demais órgãos não apresentaram lesões macroscópicas dignas de nota.

Já no segundo experimento, a soroconversão foi detectada em apenas um dos leitões infectados no 13^o DAI, cuja presença de anticorpos foi detectada somente em um dos leitões. Porém, neste caso, não foi identificada a presença do RNA viral nas amostras de suabe nasal e retal. Em decorrência destes resultados, o experimento foi estendido para 25 dias e, no 22^o DAI, o outro leitão do grupo dos infectados também apresentou anticorpos contra o vírus, com a mesma titulação do outro leitão infectado. No entanto, ainda sob essas circunstâncias, a presença do RNA viral não foi detectada nas amostras de suabes e nem nas amostras de tecidos. Durante este experimento não houve sinais clínicos de diarreia.

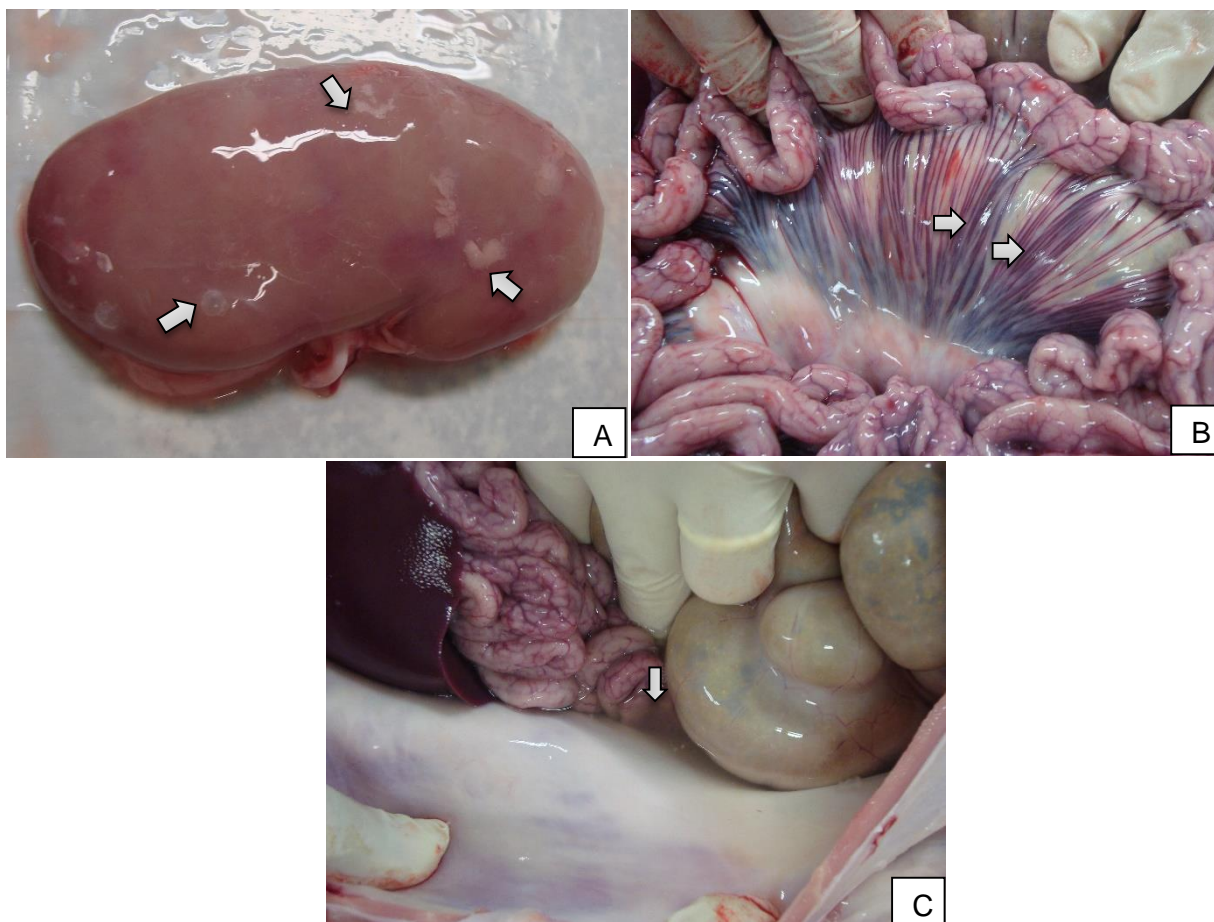


Figura 10. (A) Imagem fotográfica ilustrando lesões hemorrágicas no rim, (B) congestão dos vasos mesentéricos, e (C) hidroperitônio. Jaboticabal, SP, 2015.

No entanto, após o 15º DAI os animais inoculados apresentaram nítido emagrecimento e presença de pelos ásperos (Figura 11).

O retardo no tempo de coagulação do sangue desses animais também foi observado. Na necropsia, também foram observadas lesões macroscópicas hemorrágicas nos rins, hidroperitônio e congestão dos vasos mesentéricos nos leitões inoculados.



Figura 11. Imagem fotográfica ilustrando leitões do grupo inoculado apresentando nítido emagrecimento e aparecimento de pelos ásperos. Jaboticabal, SP, 2015.

Em ambos os experimentos realizados, os animais dos grupos controle e sentinela não apresentaram soroconversão e sinais clínicos de infecção (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados de presença de anticorpos no soro e RNA viral nos suabes e tecidos.

	Experimento 1		Experimento 2	
	Leitões Controle e Sentinela	Leitões Inoculados	Leitões Controle e Sentinela	Leitões Inoculados
Anticorpos	Negativo	Ambos os leitões	Negativo	Ambos os Leitões
RNA viral	Negativo	Suabe nasal (um leitão)	Negativo	Negativo
		Rim, Baço e Fígado (um leitão)		

5. DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos, o BVDV é capaz de infectar suínos, com produção de anticorpos contra o vírus e ocasionar sinais clínicos da infecção pelo BVDV. Um dos leitões inoculados foi capaz de excretar o vírus por via nasal após a soroconversão, entretanto o RNA viral encontrado não seria capaz causar infecção a outros animais, pois foi identificado somente na reamplificação da primeira reação, demonstrado ser uma quantidade muito pequena.

Como a excreção do BVDV foi detectada por via nasal apenas no primeiro experimento, no qual os animais inoculados mostraram alguns sinais clínicos de infecção e que foram mais acentuados, como a diarreia, sugere-se que a excreção do vírus foi em decorrência da imunossupressão do animal devido as altas temperaturas ambientais presentes no período do experimento, o qual ultrapassaram os 32°C (ESTAÇÃO AGROCLIMATOLÓGICA, UNESP/FCAV). Em condições normais, no qual não há a presença de fatores estressantes, os anticorpos produzidos pelos animais infectados são suficientes para evitar a evolução da infecção (CHASE, 2013), como ocorreu no segundo experimento.

A infecção por BVDV em suínos pode ocasionar diarreia, anemia, pelo áspero, retardo no crescimento, petéquias na pele, gastroenterite crônica, lesões nos rins e imunossupressão (TAO et al., 2013; CHASE, 2013). Dentre estes sintomas, a diarreia foi observada no primeiro experimento, enquanto no segundo, observou-se emagrecimento dos animais e pelos ásperos. Trabalhos da literatura nos quais suínos foram inoculados com BVDV não relataram a presença de sinais clínicos da infecção, mesmo após soroconversão (WALZ et al., 1999; WALZ et al., 2004; WIERINGA-JELSMA; QUAK; LOEFFEN, 2006; LANGOHR et al., 2012). Ratos e coelhos inoculados com BVDV, também não apresentaram sinal clínico da infecção viral. Entretanto o BVDV foi capaz de infectar os órgãos desses animais (BACHOFEN et al., 2014; SEONG et al., 2015).

O aumento no tempo de coagulação do sangue observado nos leitões infectados tanto no primeiro quanto no segundo experimento é uma característica comumente associada aos sinais clínicos de infecções por BVDV em bovinos e por PSC em suínos (FINO et al., 2012; TAO et al., 2013).

Apenas um animal infectado do primeiro experimento apresentou excreção viral por via nasal e presença do vírus no fígado, baço e rim. A imunossupressão ocasionada pela infecção viral (CHASE, 2013) somada ao estresse térmico devido às altas temperaturas ambientais no período em que o primeiro experimento foi realizado, podem ter contribuído para a evolução da infecção viral. Por possuírem o sistema termorregulador pouco desenvolvido, os suínos são facilmente sujeitos a estresse térmico, que pode ocasionar redução da sua integridade intestinal, com conseqüente alterações no seu metabolismo, redução na absorção de nutrientes e inibição do seu bem-estar, podendo ser fatal (PEARCE et al., 2013; FERNANDEZ et al., 2015).

A presença do BVDV nas secreções nasais e no rim de um dos animais inoculados são indicativos de que os suínos podem se tornar fontes de infecção para outros animais, caso entrem em contato com cepas altamente virulentas de BVDV. Na literatura, a excreção de BVDV por um javali persistentemente infectado também foi relatada por Terpstra e Wensvoort (1997) que detectaram o vírus em fluido orofaríngeo, urina e sêmen.

A presença de BVDV em órgãos de suínos infectados experimentalmente também foi relatada por Langohr e colaboradores (2012), que detectaram o vírus nos pulmões e linfonodo dos animais. Estes pesquisadores também relataram que a soroconversão ocorreu no 14º DAI em alguns dos animais inoculados e no 35º DAI em 99% dos animais. Tais relatos corroboram o fato de, no segundo experimento, os animais infectados terem apresentado soroconversão em um intervalo de nove dias de diferença. Entretanto, devido ao tempo máximo de permanência no isolador ser de 30 dias, o segundo experimento não pode ser estendido para pesquisas superiores a esse período.

No caso do primeiro experimento, não foi possível se certificar sobre a possibilidade de transmissão do vírus por via aerógena para os animais sentinela, uma vez que, um dia após a excreção viral pelo animal, o experimento foi encerrado. Outro fator principal deste estudo foi a cepa viral utilizada, que demonstrou ser de baixa patogenicidade. Já no segundo experimento, cuja duração foi maior, não foi detectada a excreção viral e, portanto, não haveria possibilidade da contaminação dos animais sentinela. De modo semelhante, em um trabalho com infecção de suínos por BDV, verificou-se a soroconversão e excreção viral pelos animais infectados em suabes

nasais, no entanto, não foi constatada a transmissão do vírus por via aerógena, mesmo 28 dias após a detecção da excreção viral (CABEZÓN et al., 2010). Outro estudo que utilizou inoculação experimental de BVDV em suínos demonstrou que as taxas de transmissão do vírus entre suínos, em condições de campo, são muito baixas, e que em condições experimentais, a possibilidade de transmissão viral entre suínos seria ainda mais limitada (WIERINGA-JELSMA et al. 2006).

Segundo Penrith, Vosloo e Mather (2010), o curso da infecção dependerá da virulência da cepa viral e da resposta imune do suíno. Essa afirmativa corrobora o fato de que, a cepa viral utilizada não foi capaz de demonstrar a real possibilidade de transmissão do BVDV. Em outro estudo, de prevalência do BVDV em suínos de terminação, mantidos na mesma propriedade de bovinos infectados com BVDV, a presença do vírus ou anticorpos no soro dos animais não foram detectados (O'SULLIVAN et al., 2011), afirmando que a transmissão do BVDV aos suínos é limitada.

Embora o BVDV não represente uma ameaça às populações de suínos, a presença do vírus nestes animais afeta a transmissão de PSC e a sua diagnose, o que passa a ser considerado um fator de risco (BAKER, 1987; LOEFFEN et al., 2009). Além disso, a possibilidade de excreção de BVDV pelos suínos através da infecção por cepas de campo altamente virulentas deve ser estudada, pois os suínos podem tornar-se uma fonte de infecção, tanto para outros suínos, quanto para bovinos. Dessa forma, denota-se a necessidade de estudos complementares que comprovem as vias de transmissão do BVDV entre suínos.

6. CONCLUSÃO

O BVDV é capaz de infectar os suínos e afetar rins, baço e fígado dos animais. Contudo, a cepa utilizada não foi capaz de demonstrar a real importância na transmissão do BVDV por via aerógena entre suínos, mesmo com a excreção do vírus pela via nasal.

7. REFERÊNCIAS

ABCS - Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. Panorama setorial da suinocultura – **Dossiê detalhado do setor suinícola**. Disponível em: http://issuu.com/revistaabcs/docs/panorama_setorial. Acesso em 05 de fevereiro de 2016.

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015**. Disponível em: http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf. Acesso em: 05 de fevereiro de 2016.

AGUILAR, C. E. G.; BARALDI, T. G.; SANTOS, A. C. R.; NASCIMENTO, K. A.; OLIVEIRA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. G. Implementação e avaliação das práticas de biossegurança na produção de suínos. Uma revisão. **Revista brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Brasil, v. 9, n. 2, p. 320-333, 2015.

ARENHART, S.; SILVA, L. F.; HENZEL, A.; FERREIRA, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Proteção fetal contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em vacas prenhes previamente imunizadas com uma vacina experimental atenuada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 28, p. 461-470, 2008.

BACHOFEN, C; GRANT, D. M.; WILLOUGHBY, K; ZADOKS, R. N.; DAGLEISH, M. P.; RUSSELL, G. C. Experimental infection of rabbits with bovine viral diarrhoea virus by a natural route of exposure. **Veterinary Research**, Inglaterra, v. 45, p. 34, 2014.

BAKER, J. C. Bovine viral diarrhoea virus: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Estados Unidos da América, v. 190, p. 1449-1458, 1987.

BRAGA, J. F. V.; TEIXEIRA, M. P. F.; FRANKLIN, F. L. A. A.; SOUZA, J. A. T.; SILVA, S. M. M. S.; GUEDES, R. M. C. Soroprevalência de pseudorraiva, peste suína clássica e brucelose em suínos do estado do Piauí. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 65, n. 5, p. 1321-1328, 2013.

BRUM, J. S.; KONRADT, G.; BAZZI, T.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Características e frequência das doenças de suínos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 33, n. 10, p. 1208-1214, 2013.

CABEZÓN, O.; ROSELL, R.; SIBILA, M.; LAVÍN, S.; MARCO, I.; SEGALÉS, J. Experimental infection of pigs with border disease virus isolated from *Pyrenean chamois* (*Rupicapra pyrenaica*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Estados Unidos da América, v. 22, p.360–365, 2010.

CARBREY, E. A.; STEWART, W. C.; KRESSE, J. I.; SNYDER, M. L. Natural infection of pigs with bovine viral diarrhoea virus and its differential diagnosis from hog cholera. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Estados Unidos da América, v. 169, p. 1217-1219, 1976.

CHASE, C. C. C. L. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. **Biologicals**, Inglaterra, v. 41, p. 52-60, 2013.

CHILDS, T. X Disease of cattle – Saskatchewan. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Canadá, v. 10, n. 11, p. 316-319, 1946.

CORAPI, W. V.; DONIS, R. O.; DUBOVI, E. J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use um the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinarian Research**, Estados Unidos da América, v. 51, p. 1388-1394, 1990.

CORREA, W. M., NETTO, Z. C.; BARROS, H. M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, Brasil, v. 35, p. 141-151, 1968.

DECARO, N.; MARI, V.; LUCENTE, M. S.; SCIARRETTA, R.; MORENO, A.; ARMENISE, C.; LOSURDO, M.; CAMERO, M.; LORUSSO, E.; CORDIOLI, P.; BUONAVOGLIA, C. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with ‘Hobi’-like pestivirus. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v. 155, p. 165–171, 2012.

DEEN, J.; DRITZ, S.; WATKINS, L. E.; WELDON, W. C. Analysis of variation in growth. **American Association of Swine Practitioners**, Estados Unidos da América, p. 325-326, 1998.

DENG, Y.; SUN, C.; CAO, S.; LIN, T.; YUAN, S.; ZHANG, H.; ZHAI, S.; VHUANG, L.; SHAN, T.; ZHENG, H.; WENB, X.; TONG, G. High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in chinese swine herds. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v. 159, p. 490–493, 2012.

DEREGT, D.; LOEWEN, K. G. Bovine viral diarrhea virus - biotypes and disease. **Canadian Veterinary Journal**, Canadá, v. 36, n. 6, p. 371-378, 1995.

DUGAN, M. E. R.; VAHMANI, P.; TURNER, T. D.; MAPIYE, C.; JUÁREZ, M.; PRIETO, N.; BEAULIEU, A. D.; ZIJLSTRA, R. T.; PATIENCE, J. F.; AALHUS, J. L. Pork as a Source of Omega-3 (n-3) Fatty Acids. **Journal of Clinical Medicine**, Suíça, v. 4, n. 12, p. 1999–2011, 2015.

ESTAÇÃO AGROMETERIOLÓGICA, UNESP/FCAV. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/#!/estacao-agroclimatologica/dados/estacao-convencional/>. Acesso em: 02 de março de 2016.

FERNANDEZ, M. V. S.; JOHNSON, J. S.; ABUAJAMIEH, M.; STOAKES, S. K.; SEIBERT, J. T.; COX, L.; KAHL, S.; ELSASSER, T. H.; ROSS, J. W.; ISOM, S. C.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress on carbohydrate and lipid metabolism in growing pigs. **Physiological Reports**, Estados Unidos, v. 3, 2015.

FERNELIUS, A., AMTOWER, W., LAMBERT, G., MCCLURKIN, A., MATTHEWS, P. Bovine viral diarrhea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Canadá, v. 37, p. 13-20, 1973.

FINO, T. C. M.; MELO, C. B.; RAMOS, A. F.; LEITE, R. C. Diarréia bovina a vírus (BVD) – uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Brasil, v. 2, n. 34, p. 131-140, 2012.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C. F. C.; GIL, L. H. V. G.; PILATI, C.; DRIEMEIER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A. C. Identificação do vírus da diarréia viral bovina tipo 2 (BVDV-2) no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 2, n. 20, p. 85-89, 2000.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. P. 59-86.

FREITAS, T. R. P.; SOUZA, A. C.; ESTEVES, E. G.; LYRA, T. M. P. Classical Swine Fever in Brazil: An Update. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Irã, v. 2, p. 997-1002, 2012.

GASTARDELO, T. A. R.; MELZ, L. J. A Suinocultura industrial no mundo e no Brasil. **Revista UNEMAT de Contabilidade**, Brasil, v. 3, n. 6, p. 72-92, 2014.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <
http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20142057&taxa_name=Bovine%20viral%20diarrhea%20virus%201>
e <
http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20142058&taxa_name=Bovine%20viral%20diarrhea%20virus%202> Acesso em: 04 de março de 2016.

KIRKLAND, P. D.; FROST, M. J.; FINLAISON, D. S.; KING, K. R.; RIDPATH, J. F.; GU, X. Identification of a novel virus in pigs – Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. **Virus Research**, Holanda, v. 129, n.1, p. 26-34, 2007.

LANGOHR, I. M.; STEVENSON, G. W.; NELSON, E. A.; LENZ, S. D.; WEI, H.; POGRANICHNIY, R. M. Experimental co-infection of pigs with bovine viral diarrhoea virus 1 and porcine circovirus-2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Estados Unidos da América, v. 24, n. 1, p. 51–64, 2012.

LEFORBAN, Y.; VANNIER, P.; CARIOLET, R. Protection of piglets born from ruminant pestivirus experimentally infected sows and their contact, to the challenge with hog cholera virus. **Annales de Recherches Veterinaires**, França, v. 23, p. 73–82, 1992.

LIESS, B.; MOENNIG, V. Ruminant Pestivirus Infection in Pigs. **Revue Scientifique et Technique de L`Office International des Epizooties**, França, v. 1, n. 9, p. 151-161, 1990.

LOEFFEN, W. L. A.; VAN BEUNINGEN, A.; QUAK, S.; ELBERS, A. R. W. Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v. 136, p. 240–245, 2009.

MAURER, K.; KREY, T.; MOENNIG, V.; THIEL, H.; RÜMENAPF, T. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, Estados Unidos da América, v. 78, n. 4, p. 1792-1799, 2004.

MENDEZ, E.; RUGGLI, N.; RICE, C. M. Infectious bovine viral diarrhoea virus (Strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. **Journal of Virology**, Estados Unidos da América, v. 72, p. 4737-4745, 1998.

MOENNIG, V.; BECHER, P. Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going? **Animal Health Research Reviews**, Inglaterra, v. 16, n. 1, p. 83–87, 2015.

MÓSENA, A. C. S. **Vírus da diarreia viral bovina em suínos**. 2014. 39 f. Graduação em Medicina Veterinária – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus, **Biologicals**, Inglaterra, v. 4, n. 1, p. 2-7, 2013.

NOTTAR, E. **Avaliação de causas infecciosas de baixo desenvolvimento em suínos nas fases de recria e terminação**. 2007. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012**. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf> Acesso em: 09 jan. 2016.

OLAFSON, P.; MACCALLUM, A. D.; FOX F, H. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, Estados Unidos da América, v. 36, p. 205–13, 1946.

O’SULLIVAN, T.; FRIENDSHIP, R.; CARMAN, S.; PEARL, D. L.; MCEWEN, B.; DEWEY, C. Seroprevalence of bovine viral diarrhea virus neutralizing antibodies in finisher hogs in Ontario swine herds and targeted diagnostic testing of 2 suspect herds. **Canadian Veterinary Journal**, Canadá, v. 52, p. 1342–1344, 2011.

PAREDES, J. C. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. A.; ROEHE, P. M. Soroneutralização como teste sorológico diferencial entre infecções pelo vírus da peste suína clássica e outros pestivírus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 51, n. 5, 1999.

PATON, D. J.; DONE, S. H. Congenital infection of pigs with ruminant-type pestiviruses. **Journal of Comparative Pathology**, Inglaterra, v. 111, p. 151-163, 1994.

PEARCE, S.; MANI, V.; BODDICKER, R.; JOHNSON, J.; WEBER, T.; ROSS, J. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. **Plos One**, v. 8, n. 8, e. 70215, 2013.

PENRITH, M. L.; VOSLOO, W.; MATHER, C. Classical Swine Fever (Hog Cholera): Review of Aspects Relevant to Control. **Transboundary and Emerging Diseases**, Estados Unidos da América, v. 58, p. 187–196, 2011.

POTGIETER, L. N. D. **Bovine viral diarrhoea and mucosal disease**. In: COETZER J.A.W.; TUSTIN R.C. (ed.), *Infectious diseases of livestock in Southern Africa*. 2. ed. Oxford University Press: Cape Town, 2004. vol.2, p. 946-969.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, Estados Unidos da América, v. 27, p. 493-497, 1938.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: ed. da UFSM, 2007. p. 565-591.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Brasil, v. 41, p. 396-403, 2004.

SARRAZIN, S.; DEWULF, J.; MATHIJS, E.; LAUREYNS, J.; MOSTIN, L.; CAY, A. B. Virulence comparison and quantification of horizontal bovine viral diarrhoea virus transmission following experimental infection in calves. **The Veterinary Journal**, Holanda, v. 202, p. 244–249, 2014.

SCHIRRMEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **The Journal of General Virology**, Inglaterra, v. 85, n. 12, p. 3647-3652, 2004.

SCHWEIZER, M; PETERHANS, E. Pestiviruses. **Annual Review Of Animal Biosciences**, Estados Unidos da América, v. 2, p. 141-163, 2014.

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Suinocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária 2013. Disponível em:

<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf> Acesso: em 05 de fevereiro de 2016.

SEONG, G.; OEM, J.; LEE, K.; CHOI, K. Experimental infection of mice with bovine viral diarrhoea virus. **Archives Virology**, Áustria, v. 60, p. 1565–1571, 2015.

SILVA, M. V. M.; NOGUEIRA, J. L.; JUNIOR, V. P.; FERNANDES, R. A. Diarreia viral bovina: patogenia e diagnósticos – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Brasil, v. 9, n. 16, 2011.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doença de Suínos**. Editora Cênone, 2. ed. Goiânia, 2012.

SOUZA, A. M.; PEREIRA, R. A.; YOKOO, E. M.; LEVY, R. B.; SICHIERI, R. Alimentos mais consumidos no Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**, Brasil, v. 47, p. 190-199, 2013.

STEWART, W. C.; CARBREY, E. A.; JENNEY, E. W.; BROWN, C. L.; KRESSE, J. I. Bovine viral diarrhoea infection in pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Estados Unidos da América, v. 159, p. 1556-1563, 1971.

TAO, J.; LIAO, J.; WANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; ZHU, G. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v. 165, p. 185-189, 2013.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. **Research in Veterinary Science**, Holanda, v. 45, p. 137-142, 1988.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. A Congenital infections of bovine vírus diarrhoea vírus in pigs: clinical, virological, and immunological observations. **Veterinary Quarterly**, Holanda, v. 19, p. 97-101, 1997.

TORREMORELL, M.; PIJOAN, C.; JANNI, K.; WALKER, R.; JOO, H. S. Airborne transmission of *Actinobacillus Pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. **American Journal of Veterinary Research**, Estados Unidos da América, v. 8, n. 58, p. 828-832, 1997.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. Fisiopatologia das diarréias em suínos. **Ciência Rural**, Brasil, v. 39, n. 7, p. 2233-2242, 2009.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. **Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Eldorado do Sul v.5, p.51-58, 1974.

VILCEK, S.; NETTLETON, P. F. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v. 116, p. 1–12, 2006.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEY, T. P.; KANEENE, J. B.; MAES, R. K. Comparison of type I and type II bovine viral diarrhoea virus infection in swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v. 63, p. 119-123, 1999.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEY, T. P.; MAES, R. K. experimental inoculation of pregnant swine with type 1 bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Medicine**, Inglaterra, v. 51, p. 191-193, 2004.

WALZ, P.H.; GROOMS, D.L.; PASSLER, T.; RIDPATH, J.F.; TREMBLAY, R.; STEP, D.L.; CALLAN, R.J.; GIVENS, M.D. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Estados Unidos da América, v. 24, p. 476-486, 2010.

WANG, J.; LI, Y.; MODIS, Y. Structural models of the membrane anchors of envelope glycoproteins E1 and E2 from pestiviruses. **Virology**, Estados Unidos da América, v. 454-455, p. 93-101, 2014.

WEBER, M. N. **Identificação, caracterização e análise filogenética de pestivírus em bovinos**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

WEINSKIRCHER, E.; ALIGO, J.; NING, G.; KONAN, K. V. Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. **Virology Journal**, Inglaterra, v. 6, p. 185-191, 2009.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine

serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos da América, v. 39, n. 1, p. 343-346, 2001.

WIERINGA-JELSMA, T.; QUAK, S.; LOEFFEN W. L. A. Limited BVDV transmission and full protection against CSFV transmission in pigs experimentally infected with BVDV type 1b. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v. 118, p. 26-36, 2006.