

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL
BOVINA NA GESTAÇÃO E EM NEONATOS SUÍNOS**

Daniele Araujo Pereira
Médica Veterinária

2018

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

**EFEITO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL
BOVINA NA GESTAÇÃO E EM NEONATOS SUÍNOS**

Daniele Araujo Pereira

Orientador: Dr. Luís Guilherme de Oliveira

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora em
Medicina Veterinária (Clínica
Médica Veterinária)**

2018

Pereira, Daniele Araujo
M499a Efeito da infecção experimental com o vírus da diarreia viral
bovina na gestação e em neonatos suínos/
Daniele Araujo Pereira. -- Jaboticabal, 2017
xvi, 47 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Luís Guilherme de Oliveira
Banca examinadora: Edviges Maristela Pituco, Daniela Gomes da
Silva, Hélio José Montassier, Hinig Isa Godoy Vicente
Bibliografia

1. BVDV. 2. Soroconversão. 3. *Pestivirus*. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

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

Certificado de aprovação



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: EFEITO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA GESTAÇÃO E EM NEONATOS SUÍNOS

AUTORA: DANIELE ARAUJO PEREIRA

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:


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


Pesquisadora Dra. EDVIGES MARISTELA PITUCO
Instituto Biológico / Sao Paulo, SP


Pós-doutoranda DANIELA GOMES DA SILVA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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


Profa. Dra. HINGÜISA GODOY VICENTE
Escritório de Defesa Agropecuária / Coordenadoria de Defesa Agropecuária / Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de abril de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Daniele Araujo Pereira, nascida no dia 20 de Novembro de 1985 em Lucélia, São Paulo. Doutoranda pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal de 2014 até o presente. Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Estadual de Londrina, Paraná em 2014, durante o mestrado recebeu bolsa Capes. Especialista em Gestão de Sistemas de Produção Animal, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Araçatuba. Formada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Norte do Paraná no ano de 2009. Durante o doutorado recebeu bolsa FAPESP (Processo: 2015/08531-0).

EPÍGRAFE

“Covarde seria se não enfrentasse meus medos”

Leandro Karnal

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu pai, minha mãe e meu irmão que sempre apoiaram e confiaram no meu trabalho, e com certeza inspiram seus filhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por todos os dias me dar forças para lutar pelos meus sonhos e seguir em frente, por me guiar e me permitir a realização profissional, pois pessoalmente sou muito feliz com tudo que tenho.

Quero agradecer meus pais: Maria do Carmo e Cido, meus lindos, que todos os dias quando acordam pensam em seus filhos e vivem para nós, nunca faltou amor e sempre sobrou carinho e incentivo, nosso porto seguro. Meu pai sempre pegando no pé, cuidando da nossa saúde e a mãe sempre disposta querendo ficar juntinha para fazermos tudo.

Quero agradecer meu irmão Rodrigo, meu escudo, meu amigo, que fala a mais pura verdade, na cara, através de metáforas. Ele mostra com os exemplos o que acha certo.

Agradecer o meu orientador Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, grande incentivador da suinocultura, a oportunidade de fazer meu doutorado pela Unesp de Jaboticabal/SP, nunca conheci ninguém que entenda de suínos igual o senhor. Obrigada pela confiança quando aceitou me orientar, sempre me desafiou a pensar grande e confiar que meu trabalho daria certo. Junto com o doutorado tive a oportunidade de participar do Suinesp, do SIMPORK, do “Coffee and Paper” atividades que realmente acrescentaram muito conhecimento. Agradeço cada conselho e momentos de paciência.

Quero agradecer a Dra Denise, minha amiga que me apresentou a UNESP e Prof. Dr. Luís Guilherme, nos conhecemos em Londrina/PR, na Uel, e serei eternamente grata a ela. Não bastasse, ela também me apresentou duas pessoas que mudaram a minha vida, Dra Renata e Dra Glaucenyra, minhas amigas, essenciais para o meu crescimento pessoal, tive a alegria de poder dividir a “República do Piqui”.

Dra. Renata que me ensinou a ter paciência e ser luz no caminho das pessoas que encontramos, agradeço por cada dia ao seu lado, cada incentivo e parceria, convivemos e conhecemos pessoas muito especiais como Vandinha, Inácio, José, Patrice, pessoas maravilhosas, juntas tivemos muitas turmas. Foi inesquecível.

Dra Glaucenyra que amiga parceira, agradeço a oportunidade de morar com você e aprender que não há nada que possa nos impedir de correr atrás do que queremos, sempre liderou o “Lablepbru”, mas sempre humilde para recomeçar quando necessário, saudades demais de você.

Agradeço Gustavo Claudiano e Paulo Marcusso amigos que vieram da mesma casa “Bandeirantes /PR, grandes cientistas, amigos que me ajudaram muito na pesquisa.

Agradecer o carinho de amigos que fizeram meus dias alegres como a Raquel, o Thyago Lira e Luiz Cláudio Mancha.

Quero agradecer meus amigos diários os técnicos do laboratório: o Paulo César da Silva, Cláudia Aparecida da Silva Nogueira e Renata Lemos Nagib Jorge, pessoas predispostas e essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional. Paulo “pigão” meu paizão, meu amigo, criamos uma amizade muito sincera, muito obrigada por tudo que fez por mim, cuidou, brincou, ajudou, ensinou, aprendi muito com você.

Agradeço à equipe do laboratório Imunovir; ali eu aprendi muito com o maior cientista que já conheci o Prof. Dr. Hélio José Montassier, conhecedor profundo da área da Imunologia e Virologia, e outras áreas como a Biologia Molecular; quero agradecer a oportunidade de poder trabalhar no seu laboratório. Ali também aprendi muito com suas orientadas Caren, Priscila e Taiane, minhas amigas.

Agradeço ao Bode, Nelson, Thyagão e Gaúcho, meus amigos do dia a dia.

Agradeço minha prima Vanessa que durante os quase quatro anos de doutorado sempre esteve por perto da minha família, foram muitas perdas no ano de 2017, e ela sempre esteve comigo quando precisei; obrigada linda.

Equipe do Laboratório de Pesquisa em Suínos, Igor, Henrique, Karla, Anne, Marina, Gabriel, Felipe, Maria Eugênia, Juliana e a Thaís. Sou muito feliz por ter conhecido cada um deles, aprendi muito com cada um, e pude dividir momentos que jamais serão esquecidos, com certeza essas pessoas terão um futuro brilhante.

Henrique, por quem tenho grande admiração e respeito como pessoa e profissional; obrigada por cada conselho e trabalho junto.

Agradeço à minha amiga Thaís Baraldi, você apareceu na hora certa, eu dividi outros amigos com a Thaís, se tornou uma amiga de confiança, quero levar sua amizade para a vida inteira.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Rogério André pelos direcionamentos e oportunidade de aprender com seus orientados Renan e Otávio, sempre dispostos a me atender quando precisei.

Leyde e Elka, minhas amigas de casa, foi bom demais morar com vocês, me sentia em casa junto com vocês, jamais esquecerei tudo que fizeram por mim.

Agradeço aos amigos da fazenda seu Zé e Sr. Wilson, pessoas simples, solícitas e amigas, obrigada por toda ajuda com os animais

Aos animais, às minhas porquinhas e os cachorros Otávio e WS2015 (Wesley), aprendi muito cuidando deles; foi emocionante, quantas noites sem dormir, quanto aprendizado.

Agradeço a equipe do Instituto Biológico de São Paulo, sempre disposta a nos ajudar, Dra Edviges Maristela Pituco e Dra. Líria Okuda.

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), tenho orgulho dessa fundação, todo respeito e reconhecimento pelo incentivo pela pesquisa no Brasil, e o feed back através dos relatórios; a bolsa (2015/08531-0), a reserva técnica e o auxílio que ajudaram a desenvolver o projeto.

Agradeço a empresa Thermo Fisher Scientific, pela rigorosidade com seus materiais de biologia molecular, e curso de PCR em tempo real fornecido para ajudar no projeto.

Quero agradecer a cada um de vocês que estiveram diretamente ou indiretamente envolvidos com o meu projeto de doutorado. Cada qual a sua maneira e dando o seu melhor para que esse trabalho obtivesse sucesso, de forma que ajude a esclarecer para a ciência a importância dos pestivírus na suinocultura, pois para o meu crescimento pessoal foi gratificante, essencial e satisfatório.

Aqui eu termino um ciclo, agradeço tudo que aconteceu no decorrer desses longos curtos quatro anos e agradeço a todos. Ficarão em minha memória as pessoas, e a saudade dos sorrisos e momentos compartilhados. Levo comigo cada um em meu coração, e espero ter deixado um pouco de mim em cada um. Fica a certeza que eu fui muito feliz aqui e com certeza levarei meu aprendizado para os meus futuros alunos.

SUMÁRIO

	Página
Certificado de Comissão de Ética no Uso dos Animais.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO GERAL.....	2
2.1 Objetivos específicos.....	2
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 Histórico e evolução dos <i>Pestivirus</i>	3
3.2 Etiologia.....	4
3.3 Epidemiologia.....	5
3.4 Análises clínicas.....	6
3.5 Patogenia do BVDV em bovinos e suínos.....	7
3.6 Imunidade cruzada e diagnósticos laboratoriais.....	9
3.7 Características do genoma do BVDV em suínos.....	10
3.8 prevenção e controle.....	11
4 REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 2 – Inoculação experimental com o vírus da Diarreia Viral Bovina na gestação e em neonatos suínos.....	19
Resumo.....	19
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	23
Delineamento experimental.....	23
Exame Físico e diagnóstico diferencial.....	24
Amostras.....	24
Preparo e administração do inóculo.....	25
Hemograma.....	25
Técnica de virusneutralização.....	26

Extração do RNA viral.....	26
Deteção do genoma BVDV-2 por RT-qPCR e perfil térmico.....	26
Elaboração da curva de calibração.....	27
Histopatologia.....	27
Análise estatística.....	27
Resultados.....	28
Avaliação física.....	28
Hemograma.....	28
Títulos de anticorpos virusneutralizantes.....	29
Geração de Curvas de Calibração na qRT-PCR e Quantificação do BVDV.....	30
Deteção do genoma do BVDV por RT-qPCR em porcas inoculadas experimentalmente e leitões.....	31
Histopatologia.....	32
Discussão.....	32
Conclusão.....	36
Abreviaturas.....	36
Conflitos de interesses.....	36
Contribuições dos autores.....	36
Aprovação do Comitê de Ética.....	37
Agradecimentos.....	37
Financiamentos.....	37
Detalhes dos autores.....	38
Referências.....	38
CAPÍTULO 3 – Considerações finais.....	46
APÊNDICE.....	47



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 5925/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Atuação da infecção do vírus da diarreia viral bovina na gestação e em neonatos suínos", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis 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 01 de abril de 2015.

Jaboticabal, 01 de abril de 2015.


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

EFEITO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA GESTAÇÃO E NEONATOS SUÍNOS

RESUMO – O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) está geneticamente e antigenicamente relacionado com outros membros do gênero *Pestivirus*, como o vírus da peste suína clássica, e pode provocar problemas reprodutivos, contudo ainda faltam pesquisas para esclarecer a patogenicidade em diferentes períodos gestacionais de porcas e os efeitos nos neonatos. Para o estudo foram utilizadas 12 porcas divididas em grupos (G) que foram inoculadas experimentalmente com a estirpe BVDV-2 (VS-253) na dose $10^{6,85}$ TCID₅₀ pela via oronasal, 30 dias antes da inseminação (G0;n=2) e durante a gestação, no primeiro (G1;n=2), no segundo (G2;n=3) e no terceiro terço (G3;n=3) da gestação e grupo controle (G4;n=2). Amostras de sangue e suabes nasais das porcas foram colhidas, a cada três dias a partir do dia da inoculação até o dia do parto, para o teste de virusneutralização, real time quantitativo PCR (qRT-PCR) e hemograma. No dia do parto, 40% dos neonatos foram eutanasiados para obtenção de amostras de tecidos na necropsia para histopatologia e qRT-PCR. As porcas soroconverteram entre doze e trinta e três dias após a inoculação e o vírus foi detectado no sangue entre três e doze dias, e no suabe nasal entre seis e vinte e quatro dias nas porcas do G0, G1, G2 e G3, após a inoculação, porém não foi possível a detecção de BVDV nos tecidos dos leitões e nenhuma alteração significativa encontrada através da histopatologia. A média e desvio padrão dos valores dos ciclos médios (Cq) das amostras de sangue (Cq = $34,87 \pm 0,60$) e suabe nasal (Cq = $34,61 \pm 0,87$) das porcas, corresponderam entre aproximadamente 107 a 490 TCID₅₀/mL, obtendo uma carga viral baixa em suínos e a infecção transplacentária não foi possível.

Palavras-chave: BVDV, soroconversão, viremia, qRT-PCR, *Pestivirus*.

EFFECT OF EXPERIMENTAL INFECTION WITH BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN GESTATION AND NEWBORN PIGLETS

ABSTRACT- BVDV belongs to the genus *Pestivirus*, and can cause reproductive problems, however, there is still a lack of research to clarify the pathogenicity in different gestational periods of gilts and the effects in the neonates. For the study, 12 gilts divided into groups (G) were experimentally inoculated with the strain BVDV-2 (VS-253) at the dose $10^{6.85}$ TCID₅₀ by the oronasal route, one group with 30 days before insemination (G0; n=2) and three groups during gestation, first (G1;n=2), second (G2;n=3), last third (G3;n=3) and the fifth control group (G4;n=2). Samples of blood and nasal swabs from the gilts were collected every three days from the day of inoculation until the day of delivery for virusneutralization test, quantitative PCR (qRT-PCR), blood count. On the day of delivery, 40% of the neonates were euthanized to obtain tissue samples at necropsy for histopathology and qRT-PCR. The sows were seroconverted between 12 and 33 days after inoculation and the virus was detected in the blood between 3 and 12 days, and in the nasal swab between 6 and 24 days in the G0, G1, G2 and G3 sows after inoculation, but it was not possible to detect BVDV in piglet tissues and no significant alterations were found through histopathology. The mean and standard deviation of the mean cycles (Cq) of the blood samples ($Cq = 34.87 \pm 0.60$) and nasal swab ($Cq = 34.61 \pm 0.87$) of the sows corresponded between approximately 107 to 490 TCID₅₀/mL, obtaining a low viral load in swines, and transplacental infection was't possible.

Keywords: BVDV, seroconversion, viremia, qRT-PCR, *Pestivirus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDV: Border Disease Virus

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus

CP: Citopático

NCP: Não citopático

Ct: Cycle threshold

CSF: Classical Swine Fever

EDTA: ácido etilenodiamino tetra acético

ELISA: Ensaio Imunoenzimático

G: Grupo

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

IV: Isolamento viral

ICTV: International Committee on Taxonomy of Virus

MDBK: Madin Darby Bovine Kidney

MEM: Minimum Essential Medium

OIE: World Organisation for Animal Health

ORF: Open Reading Frame

PI: Persistentemente infectado

PSC: Peste Suína Clássica

qRT-PCR: PCR quantitativa por transcriptase reversa

RNA: Ácido ribonucleico

Capítulo 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A biologia das espécies de *Pestivirus* caracteriza-se por particularidades únicas e cruciais que os tornam agentes patogênicos de sucesso, sendo desafiante do ponto de vista científico. Com os anos, a elucidação das características sobre os pestivírus teve uma grande evolução. As análises revelaram significantes semelhanças na replicação e interação do vírus com os hospedeiros, esclarecendo a base molecular de uma infecção persistente e estratégias do vírus para infectar diversas espécies de hospedeiros (TAUTZ; TEWS; MEYERS, 2015).

Este gênero é composto por quatro espécies reconhecidas, vírus da diarreia viral bovina biotipo 1 (BVDV-1), vírus da diarreia viral bovina biotipo 2 (BVDV-2), vírus da doença da fronteira (BDV) e o vírus da peste suína clássica (VPSC) e quatro espécies “atípicas” que têm sido descritas no mundo como o *Giraffe virus* isolado de girafa no Quênia (BECHER et al., 2003), *Pronghorn virus* isolado de antílope nos EUA (VILCEK et al., 2005), *Bungowannah virus* isolado em suíno na Austrália (KIRKLAND et al., 2007; PETERHANS et al., 2010) e o *Hobi-like virus*, identificado em várias partes do mundo e também no Brasil (SCHIRMEIER et al., 2004; CORTEZ et al., 2006) e todos podem causar perdas econômicas para a agroindústrias no mundo.

No entanto, somente em 2012, a BVD foi classificado como uma doença listada pela OIE (*World Organization of Animal Health*). O BVDV tem um potencial de infecção extenso que inclui uma gama de hospedeiros como bovinos, ovinos, suínos, caprinos e outros animais selvagens (RIDPATH, 2010) e não possui específica restrição de hospedeiro, pois pode infectar mais de 50 espécies de mamíferos da ordem *Artiodactyla* (PASSLER; WALZ, 2010).

Oportunamente, o BVDV quando infecta o suíno pode causar sinais clínicos semelhantes aos do VPSC, dificultando a diferenciação e problemas com a prevenção e controle destas doenças (PASSLER; WALZ, 2010). A infecção intrauterina pelo BVDV pode levar a falhas reprodutivas semelhantes às produzidas por amostras de PSCV com baixa e/ou média patogenicidade (PATON; DONE,

1994). Com isso, as medidas de controle devem basear-se no conhecimento completo da epidemiologia do BVDV, incluindo o reconhecimento de outras fontes potenciais do vírus, como os suínos. Os efeitos da infecção do BVDV em estágios gestacionais das porcas ainda não foram bem esclarecidos, entretanto, abortamentos e nascimentos de animais fracos ou inviáveis em bovinos já foram relatados. Transmissões verticais e suas diversas manifestações reprodutivas em bovinos já foram extensivamente documentadas, mas faltam estudos com os suínos.

O trabalho incluiu a avaliação das ferramentas diagnósticas sensíveis como o real time para monitorização do BVDV em porcas prenhes infectadas experimentalmente com o BVDV-2, bem como testes para detecção de anticorpos e esclarecer os efeitos deste vírus na espécie suína e seu papel dentro da cadeia epidemiológica da doença.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da infecção experimental da estirpe BVDV-2 (VS253) em diferentes períodos gestacionais de porcas e as consequências nos fetos e neonatos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir infecção experimental pelo BVDV genótipo 2 em porcas antes da inseminação e nas diferentes fases gestacionais (terço inicial, médio e final);
- Avaliar a excreção do BVDV-2 de partículas virais de porcas infectadas experimentalmente através da detecção molecular, bem como uma possível soroconversão nos animais através da Virusneutralização;
- Verificar alterações patológicas causadas pela inoculação do vírus do BVDV durante a gestação de porcas, inoculadas antes do início da gestação e em três diferentes fases gestacionais (terço inicial, médio e final);
- Analisar a patogenicidade da infecção transplacentária do BVDV nos leitões neonatos através de análise histopatológica e qRT-PCR nos tecidos e a detecção viral nos órgãos dos neonatos e quantificar o vírus.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico e evolução dos *Pestivirus*

Em 1946, Olafson e colaboradores, nos Estados Unidos e Childs no Canadá, simultaneamente descreveram uma enfermidade diarreica que apresentava alta morbidade, baixa mortalidade, de etiologia não definida, caracterizada por febre, diarreia, lesões nas mucosas e leucopenia. Essa leucopenia que era grave e observada nos animais afetados, foi o que indicou que se tratava de enfermidade com etiologia viral, e assim foi denominada de diarreia viral bovina (RAMSEY; CHIVERS, 1953). Em 1960, foi demonstrado que o BVDV estava antigenicamente relacionado com o vírus da peste suína clássica (CSFV – *Classical Swine Fever Virus*). Posteriormente, respostas sorológicas indicaram que o agente causador da doença das Fronteiras (BDV – *Border Disease Virus*) em ovinos também estava relacionado com o BVDV e CSFV (PLANT et al., 1973).

Os *Pestivirus* foram originalmente classificados nas espécies BVDV, CSFV e BDV com base nos animais hospedeiros originários. Posteriormente, descobriram que alguns pestivírus não estavam restritos somente a uma única espécie hospedeira (PASSLER; WALZ, 2010). O BVDV foi relatado em outros animais como suínos, ovinos, caprinos, cervos e ruminantes selvagens e domesticados (GROOMS et al., 2006; TAO et al., 2013).

Darbyshire (1960) confirmou a presença de antígenos de reação cruzada entre BVDV e CSFV, sendo detectados os anticorpos para CSFV em suínos assintomáticos pelo teste de imunoprecipitação em gel de ágar. Fernelius et al. (1973) isolaram o BVDV de suínos doentes, sendo este grupo de viroses denominado como *Pestivirus* neste mesmo ano (HORZINEK, 1973).

No Brasil, o primeiro relato foi uma descrição de doença gastroentérica, com aspectos compatíveis com a doença das mucosas (CORRÊA; NETO; BARROS, 1968). Os primeiros estudos sorológicos da infecção no Brasil surgiram no início da década de 70, no Rio Grande do Sul (WIZIGMANN; VIDOR; RICCI, 1971), porém a escassez de laboratórios entre os anos 70 a 90 foram responsáveis pelo pequeno número de amostras isoladas. Somente a partir da metade da década de 90, o

BVDV começou a ser estudado profundamente (FLORES et al., 2005). Mais recentemente, uma nova caracterização molecular de novos membros do gênero foi proposta com uma nova classificação com oito espécies de pestivírus que estão em discussão pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) em A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K, sendo o Pestivírus A (designação do Vírus da Diarreia Viral Bovina 1), Pestivírus B (Vírus da Diarreia Viral Bovina 2), Pestivírus C (Vírus da Peste Suína Clássica) e Pestivírus D (Vírus da Doença das Fronteiras). As sete novas espécies são os Pestivírus E (vírus *Phonghorn*), Pestivírus F (vírus *Bungowannah*), Pestivírus G (vírus *Giraffe*), Pestivírus I (vírus *Aydin-like*), Pestivírus J (vírus *rat*), Pestivírus K (Pestivírus atípico) (SMITH et al., 2017).

3.2 Etiologia

Os pestivírus são vírus pequenos (40-60 nm) e envelopados que pertencem a família *Flaviviridae*, possuem uma molécula de RNA linear, fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 12,5 Kb como genoma (COLLETT; MOENNIG; HORZINEK, 1989), e infectam exclusivamente os animais (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). O genoma possui apenas uma ORF (*open reading frame*) e as extremidades 5' e 3' contêm regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) (BROCK; DENG; RIBLET, 1992).

A classificação das espécies e subgenótipos das estirpes virais do BVDV foram determinadas a partir de análises filogenéticas de três regiões genômicas, a 5' UTR (altamente conservada), Npro (exclusiva dos pestivírus) e E2 (proteína de envelope), que revelaram duas espécies BVDV-1 e BVDV-2, 16 subgenótipos dentro do BVDV-1 (BVDV-1a – BVDV-1p) e dois subgenótipos dentro do BVDV-2 (BVDV-2a e BVDV-2b) (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2005). As proteínas não estruturais do genoma do BVDV (Npro, P7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) estão envolvidas no processo de replicação viral. As proteínas estruturais C, Erns, E1 e E2 exercem funções importantes no revestimento protetor do RNA viral e permitem a entrada e saída das partículas virais das células infectadas. Dentre estas, a glicoproteína E2 é responsável pela adsorção do vírus a receptores

específicos nas células e pela indução de anticorpos por virusneutralização (DONIS, 1995).

Os pestivírus são classificados em dois biotipos, os citopáticos (CP) e os não citopáticos (NCP) de acordo com o efeito da replicação do vírus em cultivo celular. Os biotipos CP induzem apoptose em células cultivadas enquanto os biotipos NCP não induzem apoptose (GAMLEN et al., 2010).

3.3 Epidemiologia

O bovino é o hospedeiro natural do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) possui distribuição mundial (WALZ et al., 2010), sendo a enfermidade descrita no Brasil desde os anos 60 com diversos relatos clínico-patológicos e sorológicos em bovinos. Em 1990, o vírus foi considerado como amplamente disseminado pelo rebanho bovino brasileiro, com 47,7% de ocorrência quando realizada pesquisa sorológica (PITUCO; DEL FAVA, 1998). Além disso, o BVDV está disseminado em rebanhos bovinos brasileiros, pois vários estudos mostraram números que variam de 43% a 57,56%, com uma prevalência de 66,32% em algumas regiões (SAMARA; DIAS; MOREIRA, 2004; ALMEIDA et al., 2013).

Existem poucos dados sobre a prevalência do BVDV em rebanhos suínos brasileiros, porém em um estudo feito no Estado de São Paulo onde se analisaram 360 amostras de 56 rebanhos de criações extensivas e intensivas foi encontrada uma prevalência de 4,72% soro reagentes e 26,79% dos rebanhos tinham pelo menos um animal positivo (ALMEIDA et al., 2017). No estado do Rio Grande do Norte foi encontrada uma prevalência de 4% em nível animal e 45% dos rebanhos (GATTO et al., 2016). Ao contrário da China, onde foi encontrada alta prevalência entre 20% e 34% de suínos de 11 províncias diferentes durante 2007- 2010 de BVDV em suínos com sinais clínicos, sendo predominantes os subgenótipos BVDV-1 (DENG et al., 2012).

Os suínos são suscetíveis à infecção pelo BVDV por contato direto ou indireto com ruminantes (PATON; SIMPSON; DONE, 1992), por infecção experimental (WALZ et al., 2004) e por exposição a vacinas contaminadas, mesmo assim até

hoje, a real relação de transmissão do BVDV em suínos ainda não está esclarecida (TAO et al., 2013).

A provável fonte de infecção do BVDV para os suínos são os bovinos, pois esses últimos, quando infectados, eliminam o vírus no leite, que se utilizado na alimentação dos suínos pode veicular o vírus e infectá-los (STEWART; CARBREY; JENNEY, 1971). Ainda, altas prevalências de suínos positivos são comuns em rebanhos próximos de fazendas que criam bovinos (TERPSTRA; WENSVOORT, 1991). A presença de pequenos ruminantes nas proximidades também foi apontada como um fator de risco (LOEFFEN et al., 2009). O BVDV infecta o hospedeiro susceptível pela via oronasal, se replica em células epiteliais e tecidos linfóides da orofaringe, sendo que uma pequena quantidade de vírus é suficiente para garantir a disseminação contínua, pois podem viver por períodos consideráveis no meio (TAUTZ; TEWZ; MEYERS, 2015).

3.4 Análises clínicas

A infecção de um animal com o BVDV resulta em uma viremia transitória de 10 a 14 dias de duração (HOWARD, 1990). Este fato pode ser associado com leucopenia de curto prazo (MULLER-DOBLIES et al., 2004), linfopenia (RIDPATH; NEILL; PETERHANS, 2007) trombocitopenia (BLANCHARD et al., 2010), e imunossupressão (WILHELMSSEN et al., 1990) que pode estar associada aos efeitos diretos do BVDV nos linfócitos T e B circulantes (CHASE, 2013) e apoptose de linfócitos no tecido linfóide associado ao intestino (PEDRERA et al., 2012). Na maioria das vezes, as infecções nos bovinos ocorrem de forma inaparente, com hipertermia transitória e leucopenia. Estima-se que 70% a 90% das infecções são assintomáticas (BAKER, 1995).

Algumas esteirpes de BVDV-2 são altamente virulentas e produzem trombocitopenia grave e hemorragia ou doença das mucosas em bovinos (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). Os resultados demonstram que a infecção pelo BVDV está associada à diminuição do número de plaquetas e sugere que as plaquetas podem servir como transportadoras de vírus circulantes (CORAPI; FRENCH; DUBOVI, 1989). *In vitro*, o BVDV é capaz de se replicar em uma

variedade de células de cultivo de várias espécies, até mesmo humana (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Leucopenia transitória, hiperemia, gastroenterite crônica e septicemia com hemorragias em linfonodos e rins, já foram relatadas após infecção experimental em suínos com o BVDV (STEWART; CARBREY; JENNEY, 1971). Em um estudo experimental com o BVDV-2 em suínos com 6 semanas de idade, os animais desenvolveram uma leve leucopenia e trombocitopenia (MAKOSCHEY et al., 2002).

3.5 Patogenia do BVDV em bovinos e suínos

Os bovinos podem estar infectados com BVDV de forma transitória ou persistente. A infecção transitória leva à imunidade protetora, porém a infecção persistente está associada a uma transferência específica da estirpe infecciosa que resulta na invasão dos fetos dependendo da fase da gestação (RÜFENACHT et al., 2001). O BVDV CP pode causar infecções agudas que pode ser transmitida em uma gama de fluídos, incluindo secreção nasal, urina, leite, sêmen, saliva, lágrimas e fluídos fetais (MEYLING; HOUE; JENSEN, 1990). O BVDV CP demonstrou ser capaz de induzir infecção aguda em condições experimentais (LAMBOT et al., 1997).

Os biotipos NCP são normalmente encontradas a campo e capazes de produzir infecção persistente em fetos bovinos, no caso do BVDV essas infecções persistentes ocorrem em fetos infectados entre 40 e 120 dias de prenhes. Já os CP, são considerados uma mutação do biótipo NCP e por isso são menos comuns na natureza (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Geralmente as infecções por BVDV em suínos são assintomáticas, sendo que em animais adultos foram relatados problemas reprodutivos, nascimento de leitões fracos, aborto e mumificação fetal (VANNIER; ALBINA, 1999), possibilitando uma oportunidade para o vírus se disseminar sem detecção. Em alguns casos, a infecção natural de rebanhos suínos com pestivírus foi associada a problemas de reprodução, baixa taxa de concepção, abortos e leitões natimortos (LE POTIER; MESPLEDE; WANNER, 2006), nos leitões foram descritas anemia, pele áspera, retardo de

crescimento, tremores congênitos, conjuntivite, diarreia, poliartrite, petéquias na pele e orelhas (WENSVOORT; TERPSTRA, 1988).

Em fêmeas suínas prenhes, a infecção transplacentária pode causar abortos, natimortos, nascimento de leitegadas debilitadas, más formações e até o nascimento de leitões persistentemente infectados (BECHER et al., 2003). Porcas prenhes já foram inoculadas experimentalmente com o BVDV-1 no 65º dia de gestação (WALZ et al., 2004), porém a transmissão vertical não foi detectada. Por fim, os efeitos da infecção do BVDV em diferentes estágios gestacionais das porcas ainda não foram bem esclarecidos.

A infecção intrauterina pelo BVDV pode levar a falhas reprodutivas semelhantes às produzidas por amostras do VPSC com baixa ou média patogenicidade (PATON; DONE, 1994; KULCSÁR et al., 2001). Em hospedeiros heterólogos, foram descritas infecções pelo BVDV com sinais clínicos análogos aos dos bovinos e incluem a doença em múltiplos sistemas, principalmente o sistema reprodutivo e o sistema imunológico. O resultado da infecção fetal depende do biotipo, virulência do vírus infectante e estágio de gestação no tempo de infecção. A infecção fetal pode resultar em morte fetal ou do embrião, aborto e estabelecimento de infecções persistentes ou congênitas com má formação (PASSLER; WALZ, 2010).

Já em bovinos, durante os primeiros 18 dias de prenhez, enquanto o embrião não está fixado, a infecção do embrião não ocorre porque o BVDV não penetra na zona pelúcida (MOENNIG; LIESS, 1995). Quando a infecção ocorre entre 29 a 41 pós-concepção, os cotilédones já se desenvolvem, e podem resultar em infecção e morte embrionária (MCGOWAN et al., 1993). Infecção após 30 dias de gestação e durante a o primeiro trimestre podem resultar no nascimento dos bezeros persistentemente infectado (PI) (BROWNLIE et al., 1998). Em rebanhos bovinos BVDV positivos, as más formações são relatadas quando a infecção do feto ocorre entre 100 e 150 dias de gestação, capaz de provocar problemas no sistema nervoso, pois este período relaciona-se ao estágio final da organogênese, descrevendo hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, microcefalia, mielinização deficiente da medula espinhal, atrofia da retina, microftalmia, catarata, hipotricose, braquignatismo e artrogripose (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Há uma série de relatos de inoculação com o BVDV em suínos e em porcas prenhes pela via oral, intranasal, intramuscular ou intra uterina (STEWART et al., 1980), mas os resultados são inconsistentes, pois dependem da estirpe e fase da gestação (WALZ et al., 2004; TAO et al., 2013).

3.6 Imunidade cruzada e diagnósticos laboratoriais

Os suínos podem ser infectados pelo BVDV em condições naturais, desta forma, tem-se dado grande atenção às infecções causadas por pestivírus de ruminantes (BVDV) em suínos, principalmente pelo fato de tais infecções apresentarem sinais clínicos semelhantes à PSC nos animais acometidos (MOENNIG; LIESS, 1990). Apesar da infecção por *Pestivirus* de ruminantes não se apresentar tão problemática quanto à infecção por VPSC, distinguir essas duas enfermidades pode ser muito difícil clinicamente (PATON; DONE, 1994). A relação entre os pestivírus, principalmente entre o BVDV e o VPSC, e a possibilidade de infecção de suínos pelo BVDV, levanta suspeitas sobre os métodos laboratoriais empregados no controle do VPSC, se são criteriosos o suficiente para diferenciar esses dois agentes etiológicos, pois a reação cruzada entre o BVDV e o VPSC pode ser um entrave para o correto diagnóstico (TAO et al., 2013).

Os pestivírus compartilham estruturas antigênicas comuns, por isso os testes sorológicos utilizados para detectar anticorpos anti-VPSC pode reagir de forma cruzada com anticorpos anti-pestivírus de ruminantes. A importância prática disso são as reações falsas positivas em pesquisas sorológicas para PSC, que apresenta problemas na erradicação e nas pesquisas epidemiológicas. A ausência de sinais clínicos torna o diagnóstico laboratorial essencial para confirmação, sendo necessário o uso de anticorpos monoclonais nas técnicas para identificação do vírus, como o isolamento viral (IV) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (TAO et al., 2013) e virusneutralização (VN). De forma geral, esses testes não são capazes de diferenciar a resposta sorológica de animais para os diferentes pestivírus (BAUERMANN et al., 2013).

A presença de anticorpos anti-BVDV em suínos, resultou em uma suspeita de infecção pelo VPSC e provocou o despovoamento desnecessário do rebanho,

enfatizando ainda mais o impacto das infecções por pestivírus (OGUZOGLU et al., 2001). No entanto, suínos infectados com o BVDV e desafiados com o VPSC, apresentaram títulos mais elevados anti-BVDV do que anti-VPSC, indicando que pode haver resultados falsos positivos para PSC (WIERINGA-JELSMA; QUAK; LOEFFEN, 2006).

Testes moleculares para a detecção do RNA viral têm como alvo a região 5'UTR, por ser uma região extremamente conservada entre as diferentes espécies do gênero *Pestivirus* (VILCEK et al., 1994; RIDPATH; BOLIN, 1998). Testes sensíveis como a PCR em tempo real são essenciais, Zhang et al. (2012) desenvolveram um teste de RT-PCR quantitativo TaqMan triplex para detecção e diferenciação do CSFV tipo selvagem, vacina para PSC e BVDV-1.

3.7 Características do genoma do BVDV em suínos

Apesar do BVDV estar disseminado em rebanhos suínos, as características dessas estirpes são desconhecidas, especialmente na Europa e na América, pois faltam estudos nessa área. Na China, apenas três sequências genômicas completas de cepas do BVDV isoladas de suínos estão disponíveis (SH-28, ZM-95 e SD0806), ZM-95 e SD0806 são estirpes BVDV-1, enquanto SH-28 é uma estirpe BVDV-2 (TAO et al., 2013). Em 1995, um suíno BVDV-1 (ZM-95) positivo foi identificado pela primeira vez na China (XU et al., 2006).

A comparação da homologia mostrou que os genes E2 de 12 isolados do BVDV são altamente conservados. O genoma de um dos isolados BVDV-2 (denominado SH-28) dos suínos doentes, que mostrou um efeito não citopático em culturas de células MDBK e forte reatividade com anticorpo monoclonal (MAb) Bz-53 anti-BVDV-2, foi sequenciado. O genoma de SH-28 compreende 12.279 nucleotídeos com uma grande estrutura de leitura aberta começando no nucleotídeo 386 e terminando no 12.073. A comparação genômica e as análises filogenéticas mostraram que SH-28 se inseriu no subtipo BVDV-2 e foi mais semelhante ao XJ-04 (as homologias de nucleotídeos e aminoácidos foram 89,9-93,8% e 91,1-96,9%, respectivamente), mas foi geneticamente divergente do ZM -95 (BVDV-1) (TAO et al., 2013).

Até o presente, apenas duas sequências genômicas completas de suíno BVDV-1 (ZM-95 e SD0806) estão disponíveis. Segundo Tao et al. (2013), há semelhanças entre as sequências genômicas completas da estirpe SH-28 e ZM-95 ou SD0806 em 70%. A homologia de sequência de proteínas individuais entre as cepas também foi comparativamente baixa e esses resultados indicaram que existe uma divergência genética considerável entre diferentes isolados de origem suína.

3.8 Prevenção e controle

O controle e a prevenção da infecção por BVDV exige um conhecimento suficiente da sua epidemiologia, particularmente fontes de infecção e formas de transmissão. Além disso, é necessário testes que possam ser confiáveis para notificar uma infecção individual e/ou indicar o estado de infecção dos rebanhos. Os animais PI (persistentemente infectados) são considerados a principal fonte de infecção. Os meios possíveis de transmissão de rebanhos para rebanho estão relacionados à possibilidade de transmissão pelo ar em áreas com alta prevalência de BVDV e alta densidade populacional de bovinos (BITSCH; RØNSHOLT, 1995). A grande variabilidade antigênica entre os isolados do BVDV representa um entrave para a obtenção de proteção cruzada contra o amplo espectro antigênico dos isolados, exigindo uma atualização das vacinas comerciais disponíveis (FULTON; BURGE, 2000). Desde a primeira descrição de uma relação antigênica entre VPSC e BVDV (DARBYSHIRE, 1960), começaram os estudos com o uso de BVDV para imunizar suínos contra VPSC (BAKER et al., 1969).

As infecções com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) não se limitam aos bovinos, esse fato prejudica drasticamente a implementação bem sucedida de estratégias de controle, pois os hospedeiros heterólogos podem se tornar reservatórios (PASSLER; WALZ, 2010). Entre os pestivírus, o BVDV tem sido a espécie mais intensamente estudada como agente infeccioso em espécies diferentes, sendo detectados principalmente animais soropositivos, embora a presença de anticorpos seja uma resposta limitada sobre o papel desta espécie no ciclo epidemiológico do BVDV (VAN CAMPEN et al., 2001).

4 REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, H. M. S.; GATTO, I. R. H.; SANTOS, A. C. R.; FERRAUDO, A. S.; SAMARA, S. I. ; OLIVEIRA, L.G. A Cross-Sectional and Exploratory Geospatial Study of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infections in Swines in the São Paulo State, Brazil. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 37, p. 470-474, 2017.

BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, p. 6-15. 2013.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infections. **Veterinary Clinics North of America**, v.11, p.427-444, 1995.

BAKER, J. A.; L. COGGINS, D.; ROBSON, B. E.; SHEFFY, B. E.; VOLENEC, F. J. A possibility of decreasing the cost of hog cholera eradication with use of a heterotypic BVD vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p.1866-1873. 1969.

BECHER, P.; RAMIREZ, R. A.; ORLICH, M.; ROSALES, S. C.; KONIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMIEIER, H.; THIEL, H. J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, p. 96–104, 2003.

BITSCH, V.; RØNSHOLT, L. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.11, p.627-640. 1995.

BROCK, K. V.; DENG, R.; RIBLET, S. M. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 38, n. 1, p. 39-46, 1992.

BLANCHARD, P. C.; RIDPATH, J. F.; WALKER, J. B.; HIETALA, S. K. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.128–131, 2010.

BROWNLIE, J.; HOOPER, L. B.; THOMPSON, I.; COLLINS, M. E. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) - the bovine pestivirus. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 10, p. 141-150, 1998.

COLLETT, M. S.; MOENNING, V.; HORZINEK, M. Recent advances in pestivirus research. **Journal of General Virology**, v.70, p.253-266, 1989.

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

CORRÊA, W. V.; NETO, L. Z.; BARROS, H. M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 35, n. 4, p.141-151, 1968.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; DE CASTRO, A. M. M. G.; SOARES, R. M.; PINTO, A. M. V.; ALFIERI, A. A.; FLORES, E. F.; LEITE, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolate by partial nucleotide sequencing of the 5'UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26,p.211- 216, 2006.

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

DARBYSHIRE, J. H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. **Veterinary Record**, v. 72, p. 331, 1960.

DENG, Y.; SUN, C. Q.; CAO, S. J.; LIN, T.; YUAN, S. S.; ZHANG, H. B.; ZHAI, S. L.; HUANG L.; SHAN, T. L.; ZHENG, H.; WEN, X. T.; TONG, G. Z. High prevalence of bovine viral diarrhea virus 1 in Chinese swine herds. **Veterinary Microbiology**, v.159 p.490–493. 2012.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 393-423, 1995.

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

FLORES, E. F.; WEIBEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A. Infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p.125-134, 2005.

FULTON, R. W.; BURGE, L. J. Bovine viral diarrhea types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 264-274, 2000.

GAMLEN, T.; RICHARDS, K. H.; MANKOURI, J.; HUDSON, L.; MCCAULEY, J.; HARRIS, M.; MACDONALD, A. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. **Journal of General Virology**, v. 91, p.133– 144, 2010.

GATTO, I. R. H.; LINHARES, LIMA D. C; SOUZA H. A. M; MATHIAS, L. A.; MEDEIROS, A. S. R; POLJAK, Z ; SAMARA, S. I ; OLIVEIRA, L.G . Description of risk factors associated with the detection of BVDV antibodies in Brazilian pig herds. **Tropical Animal Health and Production**, v. 1, p. 1-6, 2016.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, p. 5-19, 2004.

HORZINEK, M. C. Comparative aspects of togaviruses. **Journal of General Virology**, v. 20, p. 87-103, 1973.

HOWARD, C. J. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 9, p. 95–103. 1990.

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**, v. 129, p. 26–34, 2007.

KULCSÁR, G. P.; SOÓS, L.; KUCSERA. R.; GLÁVITS, V.; PÁLF,I. Pathogenicity of a bovine viral diarrhoea virus strain in pregnant sows: short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 49, p. 117–120, 2001.

LAMBOT, M., DOUART, A., JORIS, E., LETESSON, J. J.; PASTORET, P. P. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1041–1047, 1997.

LE POTIER, M.; MESPLEDE, A.; VANNER, P. Classical swine fever other pestiviruses. In: STRAW, B., ZIMMERMAN, H., D'ALLAIRE, S., TAYLOR, D. (Eds.), *Diseases of Swine*. 9th ed. Blackwell Publ., Ames, Iowa, p.309–311, 2006.

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

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 series B** 51, p. 191–19, 2004.

MCGOWAN, M. R.; KIRKLAND, P. D.; RODWELL, B. J.; KERR, D. R.; CARROLL, C. L. A field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus infection around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. **Theriogenology**, v. 39, p. 443-449, 1993.

MEYLING, A.; HOUE, H.; JENSEN, A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. **Revue Scientifique et Technique**, v. 9, p. 75– 93, 1990.

MOENNIG, V.; LIESS, B. Ruminant pestivirus infection in pig. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, n.1, p.151-161, 1990.

MOENNING, V.; LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 477-487. 1995.

MULLER-DOBLIES, D.; ARQUINT, A.; SCHALLER, P.; PETER M. H.; HEEGAARD, P. M. H.; HILBE, M.; ALBINI, S.; ABRIL, C.; TOBLER, K.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E.; MATHIAS ACKERMANN, M.; METZLER A. Innate Immune Responses of Calves during Transient Infection with a Noncytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhoea Virus, **Clinical and Diagnostic laboratory Immunology**, p. 302–312, 2004.

OGUZOGLU, T. C.; FLOEGEL-NIESMANN, G.; FREY, H. R.; MOENNIG, V. Differential diagnosis of classical swine fever and border disease: seroepidemiological investigation of a pestivirus infection on a mixed sheep and swine farm. **Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, v. 108, p. 210–213. 2001.

PATON, D.J.; SIMPSON, V; DONE, S.H. Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. **Veterinary Record**, v. 131, p. 185-188, 1992.

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

PASSLER, T.; WALZ, P. H. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species, **Animal health Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 191-205, 2010.

PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H.; SCHWEIZER, M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v. 41, n. 44, p. 1-14, 2010.

PEDRERA, M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; RISALDE, M. A.; MOLINA, V.; SANCHEZ-CORDON, P. J. Characterisation of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, p. 30–39, 2012.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: Simpósio internacional herpesvírus bovino e diarreia viral bovina, 1998, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 1998. p. 49-57.

PLANT, J. W.; LITTLEJOHNS, I. R.; GARDINER, A. C.; VANTSIS, J. T.; HUCK, R. A. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. **Veterinary Record**. v. 92, p. 455, 1973.

RAMSEY, F. K.; CHIVERS, W. H. Mucosal disease of cattle. **North American Veterinarian**, v. 34, p. 629–634. 1953.

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

RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, F. V.; FLORES, E. F. *Flaviviridae*. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 3. Ed. Santa Maria: UFSM, 2017. cap. 23. p. 675-708.

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

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

RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; PETERHANS, E. Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. **Vaccine**, v. 25, p. 8058–8066, 2007.

RÜFENACHT, J.; SCHALLER, P.; AUDIGÉ, L.; KNUTTI, B.; KÜPFER, U.; PETERHANS, E. The effect of infection with bovine viral diarrhoea virus on the fertility of swiss dairy cattle. **Theriogenology**, v. 56, v. 199–210, 2001.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 396-340, 2004.

SCHIRMEIER, 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. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3647–3652, 2004.

SMITH, D. B.; MEYERS, G.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MONATH, T.; MUERHOFF, A. SCOTT.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; STAPLETON, J. T.; SIMMONDS, P.; BECHER, P. Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*, **Journal of General virology**, v. 98, p. 2106-2112, 2017.

STEWART, W. C.; CARBREY, E. A.; JENNEY, E. W. Bovine viral diarrhoea infections in pigs. **JAVMA**, v. 159, p. 1556–1563, 1971.

STEWART, W. C.; MILLER, L. D.; KRESSE, J. I.; SNYDER, M. L. Bovine viral diarrhoea infection in pregnant swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 459–462, 1980.

TAO, J.; WANG, Y.; WANG, J.; WANG, J.; ZHU, G. Identification and genetic characterization of new bovine viral diarrhoea virus genotype 2 strains in pigs isolated in China, **Virus Genes**, v. 46, p. 81–87, 2013.

TAUTZ, N.; TEWS, B. A.; MEYERS, G. The Molecular Biology of Pestiviruses. **Advances in Virus Research**, v. 93. p. 147-160, 2015.

TERPSTRA C; WENSVOORT G. Bovine viral diarrhoea virus infections in swine. *Tijdschr Diergeneeskd.* v. 116, p. 943- 948, 1991.

VAN CAMPEN, H.; RIDPATH, J.; WILLIAMS, E.; CAVENDER, J.; EDWARDS, J.; SMITH, S.; SAWYER, H. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. **Journal of Wild life Diseases**, v. 37, p. 306–311, 2001.

VANNIER, P.; ALBINA, E. Bovine viral diarrhoea and border disease. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J.; **Diseases of Swine**, 8^a ed., Ames: Blackwell Science, 1999.

VILCEK, S.; RIDPATH, J. F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J. L.; WARG, J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, p.187-193, 2005.

VILCEK, S.; STROJNY, L.; DURKOVIC, B.; ROSSMANITH, W.; PATON, D. Storage of bovine viral diarrhoea virus samples on filter paper and detection of viral RNA by a RTPCR method. **Journal of Virological Methods**, v. 92, p. 19–22, 2001.

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**, v. 24, p. 476-486, 2010.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEY, T. P.; MAES, R. K. Experimental Inoculation of Pregnant Swine with Type 1 Bovine Viral Diarrhoea Virus, 51, **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 51, p. 191–193, 2004.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with a contaminated vaccines. **Research in Veterinary Science**, n. 45, p. 143–148, 1988.

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

WILHELMSSEN, C. L.; BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F.; CHEVILLE, N. F.; KLUGE, J. P. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six month-old calves. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 235–243, 1990.

WIZIGMANN G.; VIDOR T.; RICCI Z. M. T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus enfermidade das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. **Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 1, p. 52-58, 1971.

XU, X.; ZHANG, Q.; YU, X.; LIANG, L.; XIAO, H.; TU, C. Sequencing and comparative analysis of a pig bovine viral diarrhea virus genome. **Virus Research**, v. 122, p. 164–170, 2006.

ZHANG, X. J.; HAN, Q. Y.; SUN, Y.; ZHANG, X.; QIU, H. J. Development of triplex TaqMan real-time RT-PCR assay for differential detection of wild-type and HCLV vaccine strains of classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus 1. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 512–518, 2012.

Capítulo 2 – Inoculação experimental com o vírus da Diarreia Viral Bovina na gestação e em neonatos suínos

Daniele Araujo Pereira¹, Juliana Brigolin Peron¹, Henrique Meiroz Souza Almeida¹, Thaís Gasparini Baraldi¹, Igor Renan Honorato Gatto¹, Thaiane Coelho Kasmanas¹, Edviges Maristela Pituco³, Helio José Montassier², Luís Guilherme de Oliveira^{1*}

*Correspondência: luis.guilherme@fcav.unesp.br

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

²Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

³Instituto Biológico, APTA/SAA-SP, São Paulo, SP, Brasil

Resumo

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) está geneticamente e antigenicamente relacionado com outros membros do gênero *Pestivirus*, como o vírus da peste suína clássica, e pode provocar problemas reprodutivos, contudo ainda faltam pesquisas para esclarecer a patogenicidade em diferentes períodos gestacionais de porcas e os efeitos nos neonatos. Para o estudo foram utilizadas 12 porcas divididas em grupos (G) que foram inoculadas experimentalmente com a estirpe BVDV-2 (VS-253) na dose $10^{6,85}$ TCID₅₀ pela via oronasal, 30 dias antes da inseminação (G0;n=2) e durante a gestação, no primeiro (G1;n=2), no segundo (G2;n=3) e no terceiro terço (G3;n=3) da gestação e grupo controle (G4;n=2). Amostras de sangue e suabes nasais das porcas foram colhidas, a cada três dias a partir do dia da inoculação até o dia do parto, para o teste de virusneutralização, real time quantitativo PCR (qRT-PCR) e hemograma. No dia do parto, 40% dos neonatos foram eutanasiados para

obtenção de amostras de tecidos na necropsia para histopatologia e qRT-PCR. As porcas soroconverteram entre doze e trinta e três dias após a inoculação e o vírus foi detectado no sangue entre três e doze dias, e no suabe nasal entre seis e vinte e quatro dias nas porcas do G0, G1, G2 e G3, após a inoculação, porém não foi possível a detecção de BVDV nos tecidos dos leitões e nenhuma alteração significativa encontrada através da histopatologia. A média e desvio padrão dos valores dos ciclos médios (Cq) das amostras de sangue ($Cq = 34,87 \pm 0,60$) e suabe nasal ($Cq = 34,61 \pm 0,87$) das porcas, corresponderam entre aproximadamente 107 a 490 TCID₅₀/mL, obtendo uma carga viral baixa em suínos.

Palavras-chave: BVDV, soroconversão, viremia, qRT-PCR, *Pestivirus*.

Experimental inoculation with Bovine Viral Diarrhea virus in gestation and newborn piglets

Abstract

BVDV belongs to the genus *Pestivirus*, and can cause reproductive problems, however, there is still a lack of research to clarify the pathogenicity in different gestational periods of sows and the effects in the neonates. For the study, 12 gilts divided into groups (G) were experimentally inoculated with the strain BVDV-2 (VS-253) at the dose $10^{6,85}$ TCID₅₀ by the oronasal route, one group with 30 days before insemination (G0; n=2) and three groups during gestation, first (G1;n=2), second (G2;n=3), last third (G3;n=3) and the fifth control group (G4;n=2). Samples of blood and nasal swabs from the gilts were collected every three days from the day of inoculation until the day of delivery for virusneutralization test, qRT-PCR, blood count. On the day of delivery, 40% of the neonates were euthanized to obtain tissue samples at necropsy for histopathology and qRT-PCR. The sows were seroconverted between 12 and 33 days after inoculation and the virus was detected in the blood between 3

and 12 days, and in the nasal swab between 6 and 24 days in the G0, G1, G2 and G3 sows after inoculation, but it was not possible to detect BVDV in piglet tissues and no significant alterations were found through histopathology. The mean and standard deviation of the mean cycles (Cq) of the blood samples ($Cq = 34.87 \pm 0.60$) and nasal swab ($Cq = 34.61 \pm 0.87$) of the sows corresponded between approximately 107 to 490 TCID₅₀/mL, obtaining a low viral load in swines, and transplacental infection isn't possible.

Keywords: BVDV, seroconversion, viremia, qRT-PCR, *Pestivirus*.

Introdução

Os pestivírus pertencem à família *Flaviviridae* e são considerados agentes virais com grande capacidade de causar doença disseminada e persistência sem ser detectados dentro de um rebanho susceptível. O gênero *Pestivirus* foi classificado segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) em A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K, sendo o *Pestivirus A* (designação do Vírus da Diarreia Viral Bovina 1), *Pestivirus B* (Vírus da Diarreia Viral Bovina 2), *Pestivirus C* (Vírus da Peste Suína Clássica) e *Pestivirus D* (Vírus da Doença das Fronteiras). As sete novas espécies são os *Pestivirus E* (vírus *Phonghorn*), *Pestivirus F* (vírus *Bungowannah*), *Pestivirus G* (vírus *Giraffe*), *Pestivirus I* (vírus *Aydin-like*), *Pestivirus J* (vírus *rat*), *Pestivirus K* (Pestivírus atípico suíno) O gênero *Pestivirus* foi classificado segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) em A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K, como *Pestivirus A* (original designação *Bovine viral diarrhea virus 1*), *Pestivirus B* (*Bovine viral diarrhea virus 2*), *Pestivirus C* (*Classical swine fever virus*) and *Pestivirus D* (*Border disease virus*), *Pestivirus E* (Pronghorn pestivirus), *Pestivirus F* (Bungowannah virus), *Pestivirus G* (Giraffe pestivirus), *Pestivirus H* (Hobi-like pestivirus), *Pestivirus I* (Aydin-like pestivirus), *Pestivirus J* (Rat pestivirus) and *Pestivirus K* (Atypical porcine

pestivirus) [1]. O genoma completo dos *Pestivirus* possui 12.3-12.7 Kb e a região 5' UTR, a mais conservada, possui 360-390 nucleotídeos [2]. De acordo com a capacidade de produzir efeito citopático em cultivo celular, o BVDV pode ser classificado em biótipo citopatogênico (CP) e não citopatogênico (NCP), que representam a grande maioria dos vírus isolados de campo [3, 4]. Infecções agudas com estirpes de BVDV (NCP) predominantes são caracterizadas por viremia transitória com disseminação variável de vírus em bovinos [5], porém a transmissão do vírus via transplacentária pode gerar o nascimento de animais persistentemente infectados (PI) [6].

Os pestivírus foram inicialmente classificados nas espécies BVDV, PSCV e BDV com base nos animais hospedeiros originários, posteriormente foi descrito que alguns pestivírus não infectavam somente a uma única espécie hospedeira [7]. O BVDV foi relatado em outros animais como suínos, ovinos, caprinos, cervos e ruminantes selvagens e domesticados [8, 9, 10, 11, 12]. Os pestivírus são vírus com RNA altamente variáveis que causam doenças economicamente relevantes em suínos. Nas últimas duas décadas, um número crescente de novos pestivírus foi descoberto em vários tipos de animais domésticos [12, 17]. Desta forma, tem-se dado grande atenção às infecções causadas por pestivírus de ruminantes em suínos, principalmente pelo fato de tais infecções apresentarem sinais clínicos semelhantes à PSC nos animais acometidos [13].

Geralmente as infecções por BVDV em suínos são sem sinais clínicos, sendo que em animais adultos foram relatados problemas reprodutivos, nascimento de leitões fracos, aborto e mumificação fetal [14]. Em fêmeas suínas prenhes, a infecção transplacentária pode causar abortos, natimortos, nascimento de leitegadas debilitadas, má formações e até o nascimento de leitões persistentemente infectados [15]. Porcas prenhes já foram inoculadas experimentalmente com o BVDV-1 no 65º dia de gestação e a transmissão vertical não foi

possível [16], contudo os efeitos da infecção do BVDV em diferentes estágios gestacionais ainda não foram investigados. A infecção intrauterina pelo BVDV pode levar a falhas reprodutivas semelhantes às produzidas por amostras de vírus da PSC com patogenicidade baixa ou média [17, 18]. A importância do BVDV em suínos é devido à infecção e a persistência, pois podem interferir no controle e erradicação da PSC devido à reação cruzada de anticorpos em inquéritos sorológicos [17, 19].

Atualmente há poucos estudos sobre a atuação do BVDV na espécie suína, sendo este o primeiro projeto que busca esclarecer as possíveis manifestações do BVDV-2 nas porcas em diversas fases da gestação por meio de uma análise longitudinal, desde o dia da inoculação experimental do BVDV-2 até o dia do parto, a fim de trazer informações sobre a replicação viral nas porcas, resposta imune humoral e a infecção transplacentária.

Material e métodos

Delineamento experimental

Este estudo foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/SP, em parceria com o Instituto Biológico de São Paulo. Este estudo foi composto por 12 porcas divididas em cinco grupos que foram inoculadas experimentalmente com a estirpe BVDV-2 (VS-253), sendo os animais avaliados diariamente e a mensuração da temperatura realizada a cada três dias. O primeiro grupo (G0; n=2) foi inoculado 30 dias antes da inseminação; o segundo grupo (G1, n=2) inoculado no 30º dia após a inseminação (primeiro terço da gestação), o terceiro grupo (G2, n=3) inoculado no 60º dia (segundo terço da gestação), o quarto grupo (G3; n=3) inoculado no 90º dia, no terceiro terço da gestação e o quinto grupo (G4; n=2) foi o grupo controle. No dia do parto, 40% dos neonatos de cada

marrã foram eutanasiados, incluindo os natimortos e mumificados, sem ingestão do colostro (Figura 1).

Exame físico e Diagnóstico diferencial

As marrãs Naïve foram vermifugadas, inseminadas e vacinadas contra Erisipela, Parvovirose, e Leptospirose, e mensururada a temperatura a cada três dias. Foram feitos exames iniciais para o BVDV por meio da técnica da virusneutralização (VN) e para Leptospirose por meio do teste de Aglutinação Microscópica para uso como controle, e análises diferenciais para Circovirose e Parvovirose em casos de abortamentos.

Amostras

As amostras colhidas das porcas foram sangue, soro sanguíneo e suabe nasal a cada 3 dias, e a placenta no dia do parto; enquanto que nos leitões foram colhidas amostras de sangue e tecidos (cérebro, rim, pulmão, timo, tonsila, intestino delgado, baço, fígado, linfonodo mesentérico). O sangue das marrãs foi colhido pela punção da veia jugular, com agulha 40 x 1,2mm, e colocado em tubo estéril, com EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) para obtenção do sangue total. As amostras de soro foram colocadas em tubos sem EDTA e armazenadas a -20°C. Os suabes nasais foram coletados e suspensos em 300 µL de solução meio essencial mínimo (E-MEM) (*LGC Biotechnology, Cotia, São Paulo*). As amostras de sangue, placenta, suabe nasal e tecidos foram armazenadas em microtubos livre de DNase e RNase, que foram imersos em nitrogênio e após armazenadas em temperatura -80°C.

Preparo e administração do inóculo

O inóculo foi composto pela estirpe VS253 do BVDV-2 (CP), isolado na década de 90, gentilmente cedido pelo Dr. Eduardo Flores, Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS, originado da “University of Nebraska at Lincon” EUA, Dr. Rubens Donis. Após ser descongelado a 37°C, 15 ml do inóculo de BVDV-2 (VS253) 6ª MDBK (Mardin-Darby Bovine Kidney) com o título $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL, foram administrados às marrãs, sendo 5ml instilados em cada narina (após escarificação) e 5ml administrados pela via oral segundo o método de [20]. O inóculo do BVDV genótipo 2 foi utilizado neste estudo baseado em estudos que descrevem a capacidade do vírus infectar suínos afim de justificar a necessidade de avaliar a infecção durante as fases da gestação suína e comparar com estudos com inoculação experimental com o BVDV-1 [16, 21].

Hemograma

Foram realizadas as contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas e determinado o teor de hemoglobina, volume globular e índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em aparelho automático (pocH-100iV Diff, Sysmex, Roche Diagnóstica, Brasil). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada a partir do esfregaço sanguíneo corados pelo método de Rosenfeld modificado [22]. Os animais foram avaliados no dia 0, 3, 6, 12, 18, 24, 27, 36 após a inoculação experimental.

Técnica de virusneutralização

O soro sanguíneo testado foi submetido a diluições sucessivas iniciando-se em 1:10 até 1:5120, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram neutralização total das 100 TCID₅₀ em uma concentração acima de 1:10 conforme preconizado pelo “*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals*” com modificações[23]. Para a realização do teste foram utilizadas células epiteliais de rim bovino da linhagem *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) e como vírus padrão o BVDV-2 (VS-253). Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição em que foi verificada a neutralização viral, e o título final foi resultante da média geométrica das duplicatas.

Extração do RNA viral

Os ácidos nucleicos totais foram extraídos de todos os sangues das porcas usando o RiboPure™ RNA Purification Kit (*ThermoFisher Scientific*) em um sistema automatizado de extração de ácido nucleico de acordo com as instruções do fabricante. A extração do RNA viral dos tecidos, suabe nasal e alíquotas de solução estoque do BVDV foram feitas empregando-se o Trizol (*ThermoFisher Scientific*) seguindo as recomendações do fabricante. A purificação do RNA extraído foi analisada por meio do espectrofotômetro (Nanodrop) para avaliar as qualidades das amostras, 260/280 e 260/230 em combinação com qualidade espectral global.

Detecção do genoma BVDV-2 por qRT-PCR e perfil térmico

Todos os extratos de RNA foram testados quanto à presença de RNA para o BVDV por uma PCR quantitativa em tempo real. Utilizou-se o equipamento Applied Biosystems®

7500 Real-Time, e o perfil térmico da RT-qPCR foi segundo as recomendações do fabricante do VetMAX™- *Gold BVDV Detection Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Elaboração da curva de calibração

A garantia de qualidade da reação foi realizada a partir do ciclo de *threshold* (Ct) analisado pelo software do Applied Biosystems 7500 Real-Time fast. Os limites de detecção da RT-qPCR foram determinados como a última diluição do controle de RNA do vírus que apresentou curva no gráfico da reação. O ponto de corte foi estabelecido quando o $Ct > 38$. Esta curva foi elaborada a fim de relacionar os valores de Ct com a quantidade de vírus, conforme foi realizado no trabalho descrito por [24].

Histopatologia

Secções de tecidos (cérebro, timo, pulmão, rim, linfonodo mesentérico, intestino delgado, tonsila, fígado e baço) dos leitões nascidos dos G0, G1, G2, G3 e G4, coletados durante a necropsia foram cortados em fragmentos de 2 mm, colocados em formol 10%, depois em álcool 70%, e após fixadas em formalina e incluídas em parafina e os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e examinados em microscópio óptico.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados da VN foi feita usando o teste de Scott-Knott e foi detectado o efeito do tempo relacionado com o grupo, tal dado estatístico calculou o inverso da diluição, transformado na base log, calculando a área média sobre a curva de cada animal, e também foi feita a análise de variância com o título máximo de cada grupo. Os dados do hemograma, leucograma e plaquetograma foram analisados estatisticamente pelo método

descrito por Brunner e Langer [25] para observações longitudinais, utilizando o pacote “nparLD” do software R [26].

Resultados

Avaliação física

A temperatura das marrãs se manteve dentro dos padrões normais durante todo o experimento, somente a porca 323 demonstrou uma temperatura igual a 39°C no dia do aborto. Após a inoculação oronasal com o BVDV-2, a porca do G0 (323) sofreu abortamento com 60 dias de gestação (feto com 12 cm), e G2 (364) retornou o cio com 42 dias após a inseminação.

Hemograma

Houve diferença significativa na contagem de plaquetas entre os grupos ($p=0,04$) e o tempo ($p=0,05$) após a inoculação; mas com relação à contagem de leucócitos totais, não houve diferença significativa entre os grupos e o tempo (dias). Com relação à avaliação das plaquetas, duas porcas do grupo G2 (364, 729) que foram inoculadas com 60 dias apresentaram uma trombocitopenia 36 dias após serem inoculadas com o BVDV-2, e uma porca do G0 (392) apresentou trombocitopenia 24 dias após a infecção. Os resultados do hematócrito apresentaram diferença significativa entre os grupos somente em decorrência do tempo ($p=0,02$), os valores de hemoglobina e a concentração de hemoglobina corpuscular média permaneceram normais. As porcas do G1 (355) e G2 (729) apresentaram valores de eritrócito e hematócrito abaixo dos valores normais 36 dias após a inoculação, mas os outros animais se mantiveram com os níveis normais todos os dias. Com relação ao aumento de

linfócito, seis animais apresentaram uma leve linfocitose entre 3 e 6 dias após a inoculação e logo após as células retornaram à normalidade. Houve diferença significativa entre os grupos G0, G1 e G2 com relação à contagem de neutrófilo segmentado ($p=0,02$) quando foi avaliado o tempo, pois dois animais apresentaram um aumento na contagem de neutrófilo segmentado no 24°, 27°, 36° dia após a inoculação. Não constatou-se a presença de basófilos, neutrófilos e bastonetes, e o número de monócitos e eosinófilos se mantiveram dentro dos padrões normais.

Títulos de anticorpos virusneutralizantes

Anticorpos neutralizantes anti-BVDV foram detectadas nas porcas em todos os grupos inoculados experimentalmente, exceto nos grupos controle (G4) e G3. As porcas do grupo G0, G1 e G2 soroconverteram, no mínimo 12 dias e no máximo 33 dias após inoculação, sendo que os títulos variaram entre 10 a 160 (Tabela 1). Houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos anti-BVDV na análise do algoritmo de Scott-Knott entre os agrupamentos G0 e G1 e entre G0 e G2, porém não houve diferença significativa entre G1 e G2. Além disso, a análise de variância utilizando o título máximo atingido em cada grupo obteve $p=0,02$, determinando diferença significativa entre os títulos máximos de anticorpos anti-BVDV-2 das porcas entre os grupos que soroconverteram (G0, G1 e G2) (Figura 2). Não houve respostas de anticorpos anti-BVDV no soro dos leitões avaliados nascidos das porcas de todos os grupos infectados e controle.

Tabela 1 Avaliação sorológica pela técnica de virusneutralização após a inoculação experimental com o BVDV-2 (VS253) em porcas com -30 (G0), 30 (G1), 60 (G2), 90 (G3) dias de gestação e controle (G4) a cada três dias até o dia do parto (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21,24, 30, 33, 36, 45, 57, 60, 63).

Grupo	Dia																		
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	57	60	63
323 (G0)	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	20	40	20	20	20	80	160	160	80
392 (G0)	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10	10	10	20	20	80	40	80
427 (G1)	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10	20	10	10	20	40	40	10
355 (G1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	10	10	20	10	40	20
1386 (G2)	-	-	-	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	P		
364 (G2)	-	-	-	-	10	10	-	10	-	10	20	10	20	10	20	10	-		
729 (G2)	-	-	-	-	10	-	10	-	10	10	20	10	20	10	10	-	P		
348 (G3)	-	-	-	-	-	-	-	P											
365 (G3)	-	-	-	-	-	-	-	P											
365 (G3)	-	-	-	-	-	-	-	P											
301 (G4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P
347 (G4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P

(-) Ausência de títulos, (P) Parto.

Geração de Curvas de Calibração na qRT-PCR e Quantificação do BVDV

Curvas de calibração foram geradas por quantidades definidas da suspensão viral inicial do BVDV estirpe VS253 em MEM com $10^{6,85}$ TCID₅₀ e suas diluições nas amostras, $10^{5,85}$ TCID₅₀, $10^{4,85}$ TCID₅₀, $10^{3,85}$ TCID₅₀, $10^{2,85}$ TCID₅₀, $10^{1,85}$ TCID₅₀. As curvas de calibração foram construídas por plotagem obtidas dos valores de Cq sobre títulos de BVDV infeccioso nas amostras da diluição seriada e cada amostra foi medida em duplicata (Tabela 2).

Tabela 2 Relação entre as diluições virais da estirpe (VS-253) determinada através do RT-qPCR com a suspensão viral inicial e suas diluições seriadas demonstrando as médias dos Cq.

TCID 50/ml	Cq
$10^{6,85}$	15.239
$10^{5,85}$	21.886
$10^{4,85}$	26.304
$10^{3,85}$	29.700
$10^{2,85}$	33.004
$10^{1,85}$	34.746

Detecção do genoma do BVDV por RT-qPCR em porcas inoculadas experimentalmente e leitões

Um total de 452 amostras foram analisadas, sendo 130 suabes nasais das porcas, 150 sangue de porcas, 37 amostras de sangue de leitões, 11 placentas, 124 tecidos de leitões. Foi detectado o RNA viral no sangue e no suabe das porcas, porém não foi detectado o RNA na placenta, nem no sangue e tecidos dos leitões por meio da técnica do RT-qPCR. A viremia no sangue foi detectada em quatro porcas (392, 427, 729, 348) pertencentes ao grupo G0, G1, G2 e G3 respectivamente, e a excreção viral no suabe nasal foi detectada em quatro porcas (323, 392, 355, 1386) pertencentes ao grupo G0, G0, G1 e G2 respectivamente, sendo demonstrado o número de cópias/ml de cada animal. A média e desvio padrão dos valores de amostras de sangue ($Cq = 34,87 \pm 0,60$) e suabe nasal ($Cq = 34,61 \pm 0,87$). O menor valor de Cq foi encontrado em uma amostra de suabe nasal ($Cq = 33,15$) com aproximadamente 490 cópias/ml. Ocorreu uma viremia transitória nas porcas entre três e doze dias, e a excreção nasal entre seis e vinte quatro dias após a inoculação viral, sendo que a quantificação viral variou entre 107 a 490 cópias/ml (Tabela 3).

Tabela 3 Quantificação viral (cópias/ml) na qRT-PCR nas amostras de sangue e suabe nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 após a inoculação experimental com o BVDV-2 (VS253) em porcas com -30 (G0), 30 (G1), 60 (G2), 90 (G3) dias de gestação e grupo controle (G4).

Grupo	Dia								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
323 (G0)	-	-	490cópias/ml (VE)	-	-	-	-	-	-
392 (G0)	-	-	-	-	165 cópias/ml (V)	-	-	-	174cópias/ml (VE)
427 (G1)	-	213 cópias/ml (V)	-	-	-	-	-	-	-
355 (G1)	-	-	120cópias/ml (VE)	-	-	-	-	-	-
1386 (G2)	-	-	-	-	214 cópias/ml (VE)	-	-	-	-
364 (G2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
729 (G2)	-	151 cópias/ml (V)	275 cópias/ml (V)	-	-	-	-	-	-
348 (G3)	-	-	-	107cópias/ml (V)	-	-	-	-	-
365 (G3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
365 (G3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
301 (G4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
347 (G4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Ausência de cópias/ml.

Histopatologia

Não foram encontrados achados significativos no intestino delgado, pulmão, rim, tonsila, fígado, timo, baço, cérebro e linfonodo mesentérico.

Discussão

O presente estudo avaliou os resultados da infecção pelo BVDV em porcas gestantes após a inoculação experimental com a estirpe BVDV-2 CP (VS253) pela via oronasal. As marrãs soroconverteram e suportaram a replicação do BVDV, pois foi detectado RNA viral no sangue e na secreção nasal em porcas do G0, G1, G2 e G3 (Tabela 3), exceto o grupo controle (G4), pois permaneceram soronegativas durante todo experimento. Todas as marrãs infectadas soroconverteram entre o 12^o e o 33^o dia após a inoculação, exceto as porcas do

grupo G3, pois foram inoculadas com 90 dias de gestação e pariram 23 dias após a inoculação (Tabela 1). A soroconversão do G0 foi, em média, com 20 dias, do G1, 27 dias e do G2, 12 dias, com média dos três grupos de 20 dias, com títulos que variaram entre 10 a 160. Em um outro estudo, com inoculação experimental do BVDV-1 em porcas inoculadas com 65 dias de gestação, foi descrita a soroconversão com 21 dias após a inoculação com o BVDV-1, com um título que variou entre 64 a 512 [16]. Esta diferença pode ser justificada devido à complexidade da biologia do BVDV e a sua resposta imunológica no hospedeiro, pois possuem uma grande variabilidade antigênica entre os dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2) [27]. Foi feita a análise de variância (Figura 2) usando o título máximo atingido em cada animal, obtendo diferença significativa entre os grupos comparados ($p=0,02$), pois o G0 obteve um título máximo de 160, sendo maior que o G1 que obteve um título máximo 40 e G2 com um título máximo 20.

O resultado do hemograma demonstrou que duas porcas do grupo G2 (364, 729) que foram inoculadas com 60 dias apresentaram trombocitopenia 36 dias após serem inoculadas com o BVDV-2, e uma porca do G0 (392) apresentou trombocitopenia 24 dias após a infecção. Resultado semelhante foi encontrado por [28], que inoculou BVDV-2 em suínos com 6 semanas de idade, dos quais os animais desenvolveram uma leve leucopenia e trombocitopenia. Algumas estirpes de BVDV-2 são altamente virulentas e produzem trombocitopenia grave e hemorragia ou doença das mucosas em bovinos [29, 30, 31]. Os resultados sugerem que a infecção pelo BVDV pode estar associada à diminuição do número de plaquetas conforme foi descrito por [29]. Neste estudo, foi observado um aumento dos linfócitos nos primeiros dias pós-inoculação, que pode ser justificado por estarem em fase de expansão de linfócitos TCD8+, e a queda dos linfócitos ocorreu no 12º dia após a inoculação, contudo manteve-se dentro dos padrões normais para a espécie suína.

A infecção com BVDV em suínos geralmente ocorre sem sinais clínicos, permitindo uma oportunidade para o vírus espalhar sem detecção, porém em alguns casos, a infecção natural de rebanhos suínos com pestivírus de ruminantes foi associada à problemas de reprodução, má concepção, abortos e leitões natimortos [11, 17]. Neste trabalho, foi observado que uma porca de cada grupo gerou nascimento de leitões natimortos, mas somente uma porca dos grupos infectados experimentalmente (G3) pariu um feto mumificado, contudo não foi detectado o RNA viral do BVDV nos neonatos, natimortos ou mumificado. Além disso, anticorpo neutralizante para BVDV não foram detectado no soro sanguíneo dos fetos do grupo controle ou infectado que foram coletados sem a ingestão do colostro. Uma porca do G2 (364) retornou o cio após 42 dias de gestação, porém não foi encontrado abortamentos e a porca do G0 (323) abortou um feto que foi negativo no diagnóstico para Parvovirose, Circovirose e BVDV.

O vírus da diarreia viral bovina não foi detectado nos tecidos dos leitões das marrãs do grupo controle (G4) e dos grupos infectados (G0, G1, G2 e G3) através da RT-qPCR. Os resultados da histopatologia demonstraram que os leitões neonatos não apresentaram lesões significativas demonstraram e também não foi possível detectar a distribuição do BVDV nos tecidos através da qRT-PCR. A detecção do BVDV através da qRT-PCR foi possível somente nas amostras das marrãs inoculadas experimentalmente e a curva de calibração a partir da suspensão viral inicial permitiu a estimativa da quantificação de vírus quando relacionadas aos Cq das amostras (Tabela 2). O número de cópias dos vírus nas amostras de sangue e suabe nasal das porcas, variou entre 107 cópias/ml a 490 cópias/ml, sendo que a maior carga viral foi quantificada no suabe nasal com 490 cópias/ml porca 323 (G0), seis dias após a inoculação experimental (Tabela 3). A carga viral detectada nas porcas inoculadas experimentalmente com a estirpe viral VS253 do BVDV-2 foi baixa ($Cq < 35$) quando

comparada com a quantidade de suspensão viral inicial inoculada de $10^{6,85}$ cópias/ml ($Cq=15.239$), e com um outro trabalho onde foi analisada a detecção do pestívirus atípico suíno (APPV) em amostras de sêmen de cachaços, com 2×10^6 cópias/ml e valores de $Cq < 27$ [32]. A detecção do RNA do BVDV no soro e sangue foi possível em suínos que receberam uma dose de 10^5 TCID₅₀ a 10^7 TCID₅₀ do BVDV-1, porém não pode ser detectado em suínos que receberam o BVDV-2 [33]. Nosso estudo avaliou a inoculação de uma dose de $10^{5,5}$ TCID₅₀/mL, e os animais desenvolveram uma viremia transitória e excretaram o vírus, mas não houve evidências de transmissão transplacentária, pois a quantidade de vírus replicada nas porcas, não foi suficiente para causar uma transmissão vertical. Em bovinos, durante a infecção aguda, geralmente a viremia e excreção viral são transitórias e em baixos títulos, mas mesmo assim podem resultar em transmissão vertical [34]. Estudos publicados anteriormente em suínos com o vírus HoBi descreveram que os suínos soroconverteram para o tipo HoBi-like, mas o RNA viral não foi detectado em amostras de suabe nasal [35, 36] e os sinais clínicos não foram observados, obtendo baixo nível de replicação do vírus tipo HoBi, porém concluiu-se que os suínos podem suportar a replicação deste vírus [37]. Outros trabalhos descreveram BVDV induzindo viremia com uma semana e soroconversão com três semanas após a inoculação experimental em suínos [18, 28, 38].

A inoculação experimental com o BVDV-2 CP (VS253) foi conduzida com sucesso, os resultados demonstram que as porcas apresentaram uma viremia transitória, pois foi detectada em porcas de todos os grupos (G0, G1, G2, G3) que variou entre 3 dias e 12 dias, e a excreção nasal foi detectada em porcas do grupo G0 e G1 entre 6 e 24 dias após a inoculação viral. A infecção transplacentária está associada a diversos fatores como a escolha da idade gestacional, na qual ocorre a infecção e a estirpe viral [16]. Neste trabalho, diferentes fases gestacionais foram avaliadas com a infecção pelo BVDV -2, mesmo assim os resultados

confirmam a não infecção pela via vertical em leitões, concordando com os resultados de [16] que estabelece que a infecção transplacentária em suínos não foi eficiente, pois o vírus não se multiplicou com grande intensidade nas porcas, porém discordam com os estudos que demonstram a infecção transplacentária [17, 18, 39].

Conclusão

Todas as porcas inoculadas com o BVDV-2^a (estirpe VS 253 CP) demonstraram soroconversão. A detecção do RNA viral ocorreu em amostras de sangue e suabe nasal e demonstrou um comportamento transitório da infecção com uma carga viral baixa quando comparada com a quantificação suspensão viral inicial. Não houve evidências de infecção transplacentária nas porcas inoculadas experimentalmente com 30, 60 e 90 dias de gestação, pois não foi detectado anticorpos ou RNA viral nos leitões nascidos das porcas infectadas.

Abreviaturas

BVDV: Vírus da Diarreia Viral Bovina, BVD: Doenças das Fronteiras, CP: citopatogênico, Ct: Threshold, G: Grupos, HE: hematoxilina-eosina, MBDK: Mardin-Darby Bovine Kidney, MEM: meio essencial mínimo, NCP: Não citopatogênico, RNA: ácido ribonucleico, TCID: Median Tissue Culture Infectious Dose, VPSC: Vírus da Peste Suína Clássica, CEUA: Comissão de Ética no uso de Animais, qRT-PCR: quantitative reverse transcription PCR.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não houve conflito de interesses.

Contribuições dos autores

DAP organizou o delineamento experimental e executou o projeto, fez as análises laboratoriais, análise dos dados e redação do manuscrito. LGO orientou e acompanhou todas as etapas do projeto. HMSA, JBP, IRHG e TGB ajudaram na execução da parte prática do experimento. HJM e TCK apoiaram as análises moleculares. EMP forneceu o laboratório para preparação do inóculo. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Aprovação do Comitê de Ética

O experimento foi certificado pelo número de protocolo 5925/15 por estar de acordo com o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e aprovado pelo CEUA (Comissão de Ética no uso de Animais) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/SP.

Agradecimentos

Aos seguintes pesquisadores, Dra. Cláudia Del Fava, Instituto Biológico de São Paulo, Dr. Marcos Rogério André, Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, São Paulo, Dr. Luís Antonio Mathias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, São Paulo.

Financiamentos

Este trabalho foi apoiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo: 2015/08531-0) e o auxílio à pesquisa (Processo: 2016/21421-2).

Detalhes dos autores

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, Br. ²Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil. ³Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Referências

1. Smith DB, Meyers G, Bukh J, Gould EA, Monath T, Scott Muerhoff A, Pletnev A, Rico-Hesse R, Stapleton JT, Simmonds P, Becher P (2017) Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*, J Gen Virol 98:2106-2112
2. Pellerin C, Van den Hurk J, Lecomte J (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virol 203:260-267
3. Baker JC (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infections. Vet Clin North Am, 11:427-444
4. Dezen S, Otonel RAA, Alfieri AF, Lunardi M, Alfieri AA (2013) Perfil da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV1 Pesq Vet Bras 33:141-144
5. Houe H (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. Vet Clin North Am Food Anim Pract 11:521–547
6. Viet AF, Fourichon C, Seegers H (2007) Review and critical discussion of assumptions and modelling options to study the spread of the bovine viral diarrhea virus (BVDV) within a cattle herd. Epidemiol and Infect 135:706–721

7. Ridpath JF, 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet Clin North Am. Food Anim Pract* 26:105–121
8. Vilcek S, Durkovic B, Kolesarova M, Greiser-Wilke I, Paton DJ (2004) Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group *Vet Res* 35:609–615
9. Evermann JF (2006) Pestiviral infections of llamas and alpacas. *Small Rumin Res* 61: 201–206
10. Grooms DL (2006) Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis *Theriogenol* 66:624–628
11. Tao J, Wang Y, Wang J, Wang J, Zhu G (2013) Identification and genetic characterization of new bovine viral diarrhoea virus genotype 2 strains in pigs isolated in China *V Genes* 46:81–87
12. Postel A, Hansmann F, Baechlein C, Fischer N, Alawi M, Grundhoff A, Derking S, Tenhüdnfeld J, Fankuche V P, Vanessa Herder, Wolfgang Baumgärtner, Michael Wendt, Paul Becher (2016) Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci Rep* 6:1-9
13. Moennig V, Liess B (1990) Ruminant pestivirus infection in pig. *Rev Sci Tech /International Office of Epizootics* 9:151-161
14. Vannier P, Albina E (1999) Bovine viral diarrhoea and border disease. In: Straw Be, D'Allaire S, Mengeling Wl, Taylor Dj (eds) *Diseases of Swine*, Blackwell Science, Ames
15. Becher P, Ramirez RA, Orlich M, Rosales SC, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirmer H, Thiel HJ (2003) Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311:96–104

16. Walz PH, Baker JC, Mullaney TP, Maes RK (2004) Experimental inoculation of pregnant swine with type 1 bovine viral diarrhoea Virus 51, 191–193
17. Paton DJ, Done SH (1994) Congenital infection of pigs with ruminant-type pestiviruses. *J Comp Pathol* 111, 151–163
18. Kulcsar GP, Soos L, Kucsera R, Glavits V Palfi (2001) Pathogenicity of a bovine viral diarrhoea virus strain in pregnant sows: short communication. *Acta Vet Hung* 49:117–120
19. Jensen MH (1981) Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays. *Acta Vet Scand* 22:85–98
20. Cabezón O, Rosell R, Sibila M, Lavín S, Marco I, Segalés J (2010) Experimental infection of pigs with border disease virus isolated from Pyrenean chamois. *J Vet Diag Invest* 22:360–365
21. Walz PH, Baker JC, Mullaney TP, Kaneene JB, Roger K, Maes RK (1999) Comparison of Type I and Type II Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Swine, *Can J Vet Res* 63:119-123
22. Jain NC (1986) *Schalm's veterinary hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia
23. OIE (World Organization for Animal Health). Bovine viral diarrhoea. In: _____. *Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals* (2016) 608-710. Available from: Accessed: 26 Oct, 2016
24. Zeitler B, Rapp I (2013) Determination of Infectious Bovine Viral Diarrhoea Virus in Bovine Lung Lavages by a Combination of Virus Propagation in Cell Culture and Quantitative Real time PCR, *IRNS Virol* 1-9
25. Brunner E, Langer F (2010) Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. *Biomet J* 42:663-675

26. Noguchi K, Latif M, Thagavelu K, Konietschke F, Gel Y, Brunne E (2015) Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. Publication: 19/09/2012. <https://cran.r-project.org/web/packages/nparLD/nparLD.pdf>
27. Bianchi E, Martins M, Weiblen R, Flores, EF (2011) Genotypic and antigenic profile of bovine viral diarrhoea virus isolates from Rio Grande do Sul, Brazil (2000-2010) *Pesq Vet Bras* 31, 649-655
28. Makoschey B, Liebler-Tenorio EM, Biermann YM, Goovaerts D, Pohlenz JF (2002) Leukopenia and thrombocytopenia in pigs after infection with bovine viral diarrhoea virus-2 (BVDV-2). *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 109:225–230
29. Corapi WV, French, TW, Dubovi EJ (1989) Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 63:3934-43
30. Ridpath JF, Bolin, SR, Dubovi EJ (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virol* 205:66-74
31. Carman S, Van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi EJ, Tremblay R, Bolin SR, Godkin A, Anderson N (1998) Severe acute bovine viral diarrhoea (BVD) in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest* 10:27-35
32. Gatto IRH, Arruda PH, Visek CA, Victoria JG, Patterson AR, Krull AC, Schwartz KJ, Oliveira LG, Arruda BL. Detection of atypical porcine pestivirus in semen from commercial boar studs in the United States, *Transbound Emerg Dis* 65: 339-343
33. Walz PH, Baker JC, Mullaney TP, Kaneene JB, Roger K, Maes RK (1999) Comparison of Type I and Type II Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Swine, *Can J Vet Res* 63:119-123
34. Thurmond MC (2005) Virus Transmission In: Goyal SM, Ridpath JF (eds), *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control*. Blackwell Publishing, Oxford

35. Decaro N, Mari V, Lucente MS, Sciarretta R, Moreno A, Armenise C, Losurdo M, Camero M, Lorusso E, Cordioli P, Buonavoglia C (2012) Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. *Vet Microbiol* 155:165–171
36. Schirrmeyer H, Strebelow G, Depner K., Hoffmann B, Beer M (2004) Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol* 85:3647-3652
37. Bauermann FV, Falkenberg SM, Decaro N, Flores EF, Ridpath JF (2015) Experimental infection of calves, sheep, goats and pigs with HoBi-like viruses by direct inoculation or exposure to persistently infected calves, *Vet Microbiol* 181:289-293
38. Stewart WC, Miller LD, Kresse JI, Snyder, ML (1980) Bovine viral diarrhea infection in pregnant swine. *Am J Vet Res* 41:459–462
39. Terpstra CG, Wensvoort (1997) A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, Virology and immunology observation *Vet Q* 19:97–101

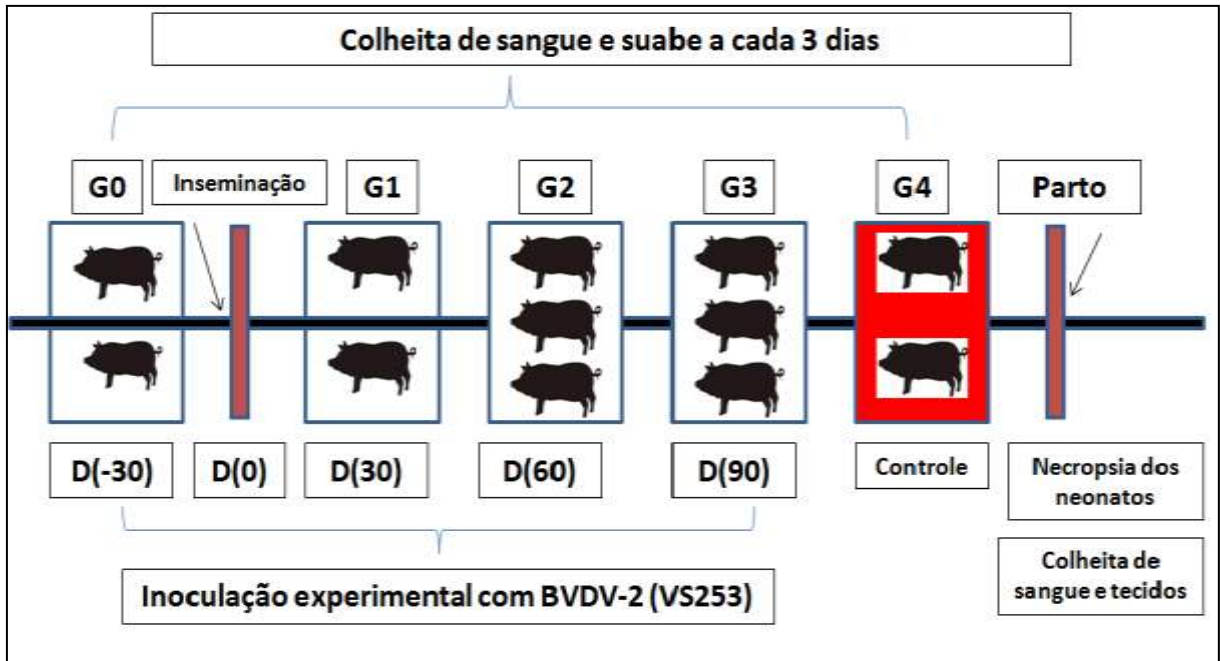


Figura1 Ilustração esquemática com a programação de colheita das amostras desde a inoculação do grupo de porcas até a eutanásia dos leitões (D=dia; G = grupo), mostrando quando cada grupo foi inoculado com o BVDV-2 (VS-253), 30 dias antes da inseminação (G0), e durante a gestação com 30 (G1), 60 (G2) e 90 (G3) dias.

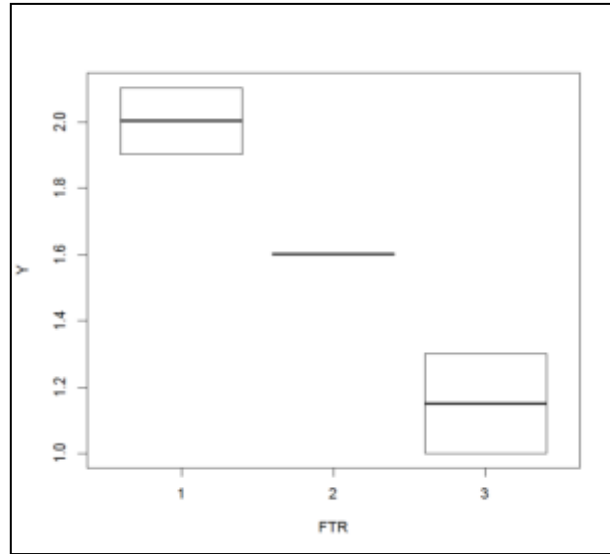


Figura 2 Análise de variância entre os grupos G0 (1) título 160, G1(2) título 40 e G2 (3) título 20, comparando o título máximo de anticorpo em cada grupo através do teste de virusneutralização.

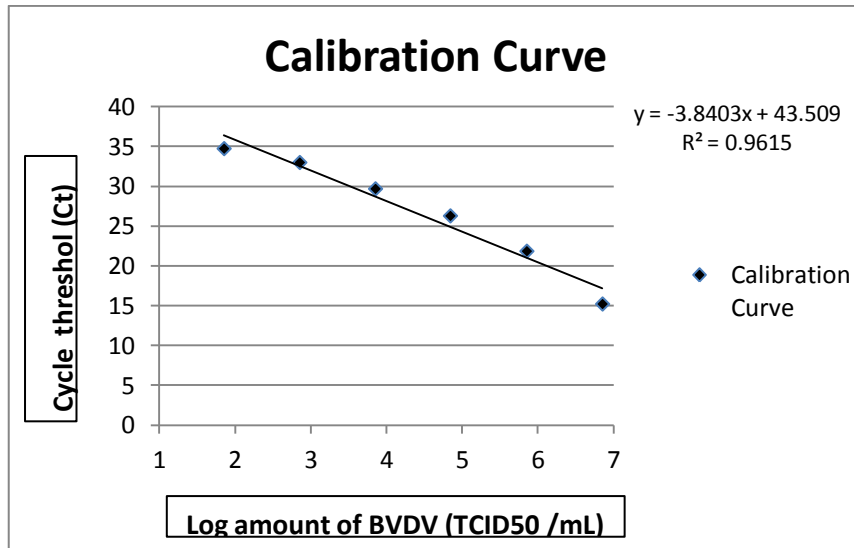


Figure 3 Curva de calibração no qRT-PCR usando a suspensão viral com a dose $10^{6,85}$ e suas diluições seriadas até $10^{1,85}$ TCID50/ml. O quadrante preto indica os valores médios dos valores de Ct das amostras.

Capítulo 3 - Considerações finais

Os pestivírus são patógenos altamente interessantes e economicamente importantes de serem analisados e estudados, possuem uma característica ligada ao genoma por ser um RNA e de fácil mutação. Nos últimos anos, com a evolução dos testes moleculares, muitos trabalhos relacionados na área elucidaram características surpreendentes do vírus e noção de interação com diferentes hospedeiros. Apesar de toda evolução da biologia molecular e investigação detalhada de muitos aspectos relacionados aos pestivírus, muitos aspectos da biologia ainda são obscuros, sendo uma área ampla para ser pesquisada, principalmente com relação às estruturas das proteínas pestivirais e seus hospedeiros.

Neste trabalho, uma análise ampla sobre a atuação e o impacto do BVDV-2 em diferentes fases da gestação suína foi investigada. As respostas imunes inatas e adaptativas à infecção pelo BVDV podem ser avaliadas pela idade fetal, estágio de desenvolvimento imune que determina o resultado das infecções do feto, porém a infecção transplacentária na espécie suína com a estirpe VS-253 CP não foi possível, pois a quantidade de carga viral detectada nas amostras de sangue e suabe foram baixas quando comparadas com a carga viral inicialmente inoculada em cada animal de $10^{6,85}$ TCID₅₀.

Apesar da variedade de apresentações clínicas em bovinos, é sugerido que as maiores perdas econômicas em decorrência da infecção pelo BVDV são oriundas dos problemas reprodutivos. Apesar de analisarmos diferentes terços da fase de gestação das porcas, independente do momento da inoculação experimental, a estirpe viral não conseguiu atravessar a placenta que serviu como uma barreira de proteção. Contudo após a inoculação experimental, o BVDV-2 conseguiu se replicar nas porcas que foram capazes de excretar o vírus, porém fica evidente que o BVDV-2 em suínos não foi capaz de provocar uma infecção exacerbada.

Por fim, foi esclarecida através do uso de técnicas mais sensíveis, a replicação do BVDV nas porcas, sendo constatada a soroconversão nos animais e o maior título alcançado, fase de viremia, excreção viral e não transmissão do vírus pela via transplacentária, com isso a não infecção dos leitões

APÊNDICES

Apêndice A. valores de referências para o hemograma suíno.

Parâmetros	Valores
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5-8
Hemoglobina (g/dL)	10-16
Hematócrito (%)	32-50
Volume Globular Médio (Fl)	50-68
Hemoglobina Globular Média (Pg)	16-22
Concentração de Hemoglobina Globular Média (g/dL)	30-34
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11-22
Basófilos (%)	0-4
Eosinófilos (%)	0.5-11
Neutrófilo bastonete (%)	0-4
Neutrófilos segmentados (%)	28-47
Linfócitos (%)	32-62
Monócitos (%)	2-10
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	200-800

Fonte: Laboratório de Patologia Clínica veterinária – Hospital veterinário / Unesp – Campus de Jaboticabal.