

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

**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO PELA LÂMINA D'ÁGUA
DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM LEITÕES
DESMAMADOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Karla Alvarenga Nascimento

Médica Veterinária

2017

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

**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO PELA LÂMINA D'ÁGUA
DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM LEITÕES
DESMAMADOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Karla Alvarenga Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

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

2017

N244a Nascimento, Karla Alvarenga
Avaliação da transmissão pela lâmina d'água do vírus da Diarreia
Viral Bovina em leitões desmamados experimentalmente infectados /
Karla Alvarenga Nascimento. -- Jaboticabal, 2017
xvii, 44 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Luís Guilherme de Oliveira
Banca examinadora: Estevam Guilherme Lux Hoppe, Márcio
Garcia Ribeiro
Bibliografia

1. BVDV. 2. Isoladores. 3. RT-PCR. 4. Via de Transmissão. 5.
Virusneutralização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.4

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

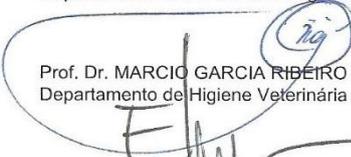
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO PELA LÂMINA D'ÁGUA DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM LEITÕES DESMAMADOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

AUTORA: KARLA ALVARENGA NASCIMENTO

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra 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


Prof. Dr. MARCIO GARCIA RIBEIRO
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública / FMVZ / UNESP - Botucatu/SP


Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 09 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KARLA ALVARENGA NASCIMENTO – Nascida em 30 de março de 1989, na cidade de Catalão, Estado de Goiás, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Goiás – Câmpus Jataí em 2014. Realizou o estágio curricular no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ – UNESP, Câmpus Botucatu, sob supervisão do Prof. Dr. Hélio Langoni. Concluindo a graduação com o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Reação de Imunofluorescência Indireta no Diagnóstico da Toxoplasmose Canina”, sob orientação da Prof^a. Dra. Raphaella Barbosa Meirelles Bartoli. Em 2015, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista Fapesp, com o número de processo 2015/07098-1, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. O projeto obteve auxílio Fapesp, com o número de processo 2014/13590-3.

“Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do homem... Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda. Toda criatura em desgraça tem o mesmo direito de ser protegida.”

São Francisco de Assis

Aos meus pais Adenir e Maria Goretti e
minha irmã Aline, pelo esforço e contribuição
para que meu sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

Se hoje comemoro essa conquista, se deve em primeiro lugar a Deus por estar ao meu lado me mostrando o caminho a seguir e não desistir nunca dos meus objetivos.

Aos meus pais Adenir e Goretti, meu porto seguro, minha razão de viver, pais exemplares que apesar da distância sempre se fizeram presentes, seja por ligações ou visitas, muitas vezes sacrificaram suas vidas em busca do meu sonho. A minha irmã Aline, pessoa muito especial e importante que juntamente com meu cunhado Silfarnei, compartilharam todas minhas vitórias. As minhas avós Maria e Benedita, por toda ajuda dada, pela palavra de Fé e por colocar-me em todas as orações. Aos meus tios e primos que sempre torceram por mim. Ao meu namorado Jair Junior, por toda ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, pela orientação, empenho dedicado à elaboração deste trabalho. O senhor me deu uma oportunidade quando eu mais precisei, acreditou em mim e nas minhas capacidades, e por tudo isso lhe agradeço.

Aos companheiros de laboratório Anne Caroline, Daniele Araujo, Lívia Boarini, Felipe Gomes, pelos momentos de ajuda nas coletas, aprendizado e descontração no Laboratório de Pesquisa em Suínos. Muito obrigada!

Aos pós-graduandos, Igor Gatto pela ajuda nas coletas, produção de inóculo e testes sorológicos, fundamentais ao meu experimento; e Henrique Almeida, além de colaborar nos experimentos, foi por meio de você que conheci o professor Luís Guilherme. Muito obrigada! Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Muito obrigada ao aluno de iniciação científica Luiz Gabriel Carnielli (Q-xada), pelo excelente trabalho e disponibilidade para que os experimentos fossem conduzidos da melhor forma possível.

Um agradecimento especial à amiga de mestrado Marina Mechler, por toda contribuição, companheirismo tanto nos momentos alegres quanto nos mais difíceis. E ao seu namorado Rodrigo Dreibi, muito obrigada pela colaboração em parte da execução e análises dos dados. Contem sempre comigo.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília (LPV/UnB), em especial ao residente André Leonardo e Professores Pedro Pedroso e Juliana Targino, pela colaboração em parte das análises dos experimentos.

Aos meus amigos de graduação Alana Lucena, Ronaldo Inácio e Yasmine Azarias, por todas as palavras de carinho e incentivo para que a jornada se tornasse mais tranquila. Ao companheiro de pós-graduação Eric Mateus, pelo apoio, moradia no período de estágio. Vocês são muito especiais.

A Prof^a. Dra. Raphaella Barbosa Meirelles Bartoli, pela indicação, incentivo e apoio, para que eu pudesse iniciar o curso de pós-graduação na FCAV/Jaboticabal.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal e a todos os funcionários pela colaboração e empenho para que o projeto pudesse ser executado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos processo número 2015/07098-1, e o auxílio financeiro com o número de processo 2014/13590-3, que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa finalizado nessa dissertação.

SUMÁRIO

	Página
Certificado Comissão de Ética para Experimentação Animal	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
CAPÍTULO I – Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Agente etiológico	3
2.2 Epidemiologia	5
2.3 Patogenia e sinais clínicos.....	6
3. REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO 2 – Transmissão do vírus da Diarreia Viral Bovina pela via lâmina d’água em leitões experimentalmente infectados.....	13
RESUMO.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Animais	15
2.2 Isoladores	15
2.3 Delineamento experimental.....	17
2.4 Teste de Virusneutralização (VN)	19
2.5 Histopatologia e Imunohistoquímica (IHQ)	20
2.6 RT-PCR	20
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS	26

CAPÍTULO 3 – Transmissão pela via naso-nasal do vírus da Diarreia Viral Bovina em leitões experimentalmente infectados.....	29
RESUMO.....	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Animais	31
2.2 Isoladores	31
2.3 Delineamento experimental.....	33
2.4 Teste de Virusneutralização (VN)	35
2.5 Histopatologia e Imunohistoquímica (IHQ)	35
2.6 RT-PCR	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Soroconversão e excreção de material genético viral	37
3.2 Avaliação histopatológica e Imunohistoquímica	39
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS	41

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

unesp



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

Jaboticabal, 08 de maio de 2014.


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

AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO PELA VIA LÂMINA D'ÁGUA DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM LEITÕES DESMAMADOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO – Os pestivírus possuem importância significativa na suinocultura, sendo que os suínos podem ser infectados pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em condições naturais. O presente estudo teve como objetivo induzir a infecção experimental do BVDV-1 em leitões desmamados e avaliar a excreção e possível transmissão do vírus pelas vias lâmina d'água e naso-nasal. Foram conduzidos dois experimentos e uma repetição para cada via de transmissão avaliada. No total foram selecionados 24 leitões, sendo utilizados seis por experimento, divididos em grupos controle (n=2), sentinela (n=2) e infectado (n=2), utilizando isoladores, projetados para estabelecer o contato entre os animais apenas pela via de transmissão em estudo. O grupo infectado recebeu um inóculo contendo BVDV-1, estirpe Singer, enquanto que os grupos controle e sentinela foram inoculados com meio E-MEM. Os animais permaneceram nos isoladores por 25 dias, período em que foram coletadas amostras de suabe nasal diariamente e sangue a cada sete dias. Ao final, os animais foram eutanasiados e necropsiados, sendo realizada coleta de fragmentos de órgãos para histopatologia, imunohistoquímica e RT-PCR. Quando avaliada a via de transmissão lâmina d'água, apenas um animal infectado apresentou excreção de material genômico a partir do 6º dia pós-infecção (dpi), e um animal sentinela apresentou excreção no 20º dpi. Nestes animais, a soroconversão ocorreu no 25º dia apresentando título de anticorpos igual a 20. Um animal infectado não apresentou soroconversão durante o período amostrado, porém houve excreção a partir do 5º dpi. Na repetição do experimento, apenas um animal infectado soroconverteu ao 25º dia, com título de anticorpos de 20, cuja excreção do material genômico foi detectada ao 21º dpi. Nos animais sentinelas, apenas um apresentou excreção no 13º dpi. Em relação ao experimento naso-nasal, os animais infectados apresentaram excreção de material genético a partir do 17º dpi, porém a soroconversão não foi observada em todos os animais. Na repetição do experimento naso-nasal a soroconversão foi detectada em apenas um dos leitões infectados no último dia de experimento, com título de anticorpos de 20. A excreção do material genômico ocorreu nos dois animais infectados, sendo que um animal apresentou excreção a partir do dia 10 e o outro a partir do 18º dpi. Em relação à macroscopia e microscopia, os animais de todos os experimentos não apresentaram lesões significativas. O presente estudo demonstra que os suínos são susceptíveis ao BVDV, possibilitando a excreção e servir como fonte de infecção. Evidenciou-se que a lâmina d'água pode veicular o BVDV de um suíno infectado para outro, ressaltando a importância e o risco de transmissão. A possibilidade de transmissão do BVDV pela via naso-nasal em leitões não foi provada dentro do período avaliado.

Palavras-chave: BVDV, isoladores, RT-PCR, via de transmissão, virusneutralização

EVALUATION OF THE TRANSMISSION BY BACK POND PEN OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN EXPERIMENTALLY INFECTED WEED PIGS

ABSTRACT – Pestiviruses have significant importance in swine breeding, and pigs can be infected by Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) under natural conditions. The present study aimed to induce the experimental infection of BVDV-1 in weaned piglets and to evaluate the excretion and possible transmission of the virus through the water and naso-nasal routes. Two experiments and one replicate were conducted for each evaluated route of transmission. In total, 24 piglets were selected, and six were used per experiment, divided into control (n = 2), sentinel (n = 2) and infected (n = 2) groups using isolators, designed to establish contact between animals only by Route of study. The infected group received an inoculum containing BVDV-1, Singer strain, while the control and sentinel groups were inoculated with E-MEM medium. The animals remained in the isolators for 25 days, during which samples of nasal swab and blood were collected every seven days. At the end, the animals were euthanized and necropsied, and organ fragments were collected for histopathology, immunohistochemistry and RT-PCR. When the water-borne transmission pathway was evaluated, only one infected animal showed excretion of genomic material from day 6 post-infection (dpi), and one sentinel animal showed excretion at the 20th dpi. In these animals, seroconversion occurred on day 25 with an antibody titer equal to 20. An infected animal did not present seroconversion during the sampled period, but there was excretion from the 5th dpi. In the repeat of the experiment, only one infected animal was seroconverted at day 25, with antibody titer of 20, whose excretion of the genomic material was detected at 21th dpi. In sentinel animals, only one had excretion at the 13th dpi. In relation to the naso-nasal experiment, the infected animals presented excretion of genetic material from the 17th dpi, but seroconversion was not observed in all the animals. In the repetition of the naso-nasal experiment, seroconversion was detected in only one of the infected piglets on the last day of the experiment, with an antibody titre of 20. Excretion of the genomic material occurred in the two infected animals, and one animal had excretion from the Day 10 and the other from the 18th dpi. Regarding macroscopy and microscopy, the animals of all experiments did not present significant lesions. The present study demonstrates that pigs are susceptible to BVDV, allowing excretion and serve as a source of infection. It has been shown that the water table can transport BVDV from one infected pig to another, emphasizing the importance and risk of transmission. The possibility of BVDV transmission by the nasal nasal route in piglets has not been proven within the evaluated period.

Keywords: BVDV, insulators, RT-PCR, transmission route, virusneutralization

LISTA DE ABREVIATURAS

APPV: Atypical Porcine Pestivirus

BDV: Border Disease Vírus (Vírus da Doença das Fronteiras)

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus

BVDV-1: Bovine Viral Diarrhea Virus genótipo 1

BVDV-2: Bovine Viral Diarrhea Virus genótipo 2

CEUA: Comitê de Ética no Uso dos Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

cp: biótipo citopatogênico

DM: Doença das Mucosas

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

E-MEM: Eagle Minimal Essential Medium

HE: Hematoxilina-Eosina

IHQ: Imunohistoquímica

MDBK: Madine Darby Bovine Kidney

ncp: biótipo não citopatogênico

OIE: Organização Mundial da Saúde Animal

PI: Persistentemente Infectado

PSC: Peste Suína Clássica

RT-PCR: Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

TCID₅₀: 50% Tissue Culture Infective Dose

VN: Virusneutralização

VPSC: Vírus da Peste Suína Clássica

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição de leitões por grupo para avaliação da transmissão do BVDV pela via lâmina d'água, em animais experimentalmente infectados. Jaboticabal, SP, 2015-2016.....	18
Tabela 2. Resultados obtidos pela RT-PCR e virusneutralização para detecção molecular e sorológica do BVDV em leitões detalhando o momento da excreção e da soroconversão. Jaboticabal, SP, 2015-2016.....	23
Tabela 3. Distribuição de leitões por grupo para avaliação da transmissão do BVDV pela via naso-nasal, em animais experimentalmente infectados. Jaboticabal, SP, 2015-2016.....	34
Tabela 4. Resultados obtidos pela RT-PCR e virusneutralização para detecção molecular e sorológica do BVDV em leitões detalhando o momento da excreção e da soroconversão. Jaboticabal, SP, 2015-2016.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema ilustrativo da morfologia do vírus da família <i>Flaviviridae</i> e da estrutura do genoma do gênero <i>Pestivirus</i>	4
Figura 2. Imagem de isoladores de aço inox projetados para estudos epidemiológicos de vias de transmissão em leitões. Laboratório de Pesquisa em Suínos, Jaboticabal, SP, 2015.....	16
Figura 3. Representação esquemática de montagem dos isoladores para estudo da via de transmissão pela lâmina d'água. Jaboticabal, SP, 2016.....	17
Figura 4. Representação esquemática da programação de colheita de amostras da chegada à eutanásia dos animais. Jaboticabal, SP, 2016.....	19
Figura 5. Imagem de isoladores de aço inox projetados para estudos epidemiológicos de vias de transmissão em leitões. Laboratório de Pesquisa em Suínos, Jaboticabal, SP, 2016.....	32
Figura 6. Representação esquemática de montagem dos isoladores para estudo da via de transmissão pelo contato naso-nasal. Jaboticabal, SP, 2016.....	32
Figura 7. Imagem do orifício para contato naso-nasal	33

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Pestivirus*. Os vírus pertencentes a este gênero são esféricos de 40 a 60 nm de diâmetro, com nucleocapsídeo possivelmente icosaédrico revestido externamente por envelope derivado das membranas da célula do hospedeiro (WEBER, 2013; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

Os pestivírus possuem importância significativa na suinocultura, uma vez que os suínos são hospedeiros naturais do Vírus da Peste Suína Clássica (VPSC) e do vírus Bungowannah e hospedeiros eventuais de Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e do Vírus da Border Disease (BDV). As cepas de VPSC são as mais adaptadas aos suínos e são responsáveis por elevadas perdas econômicas (MOENNIG, 2000; VILCEK; BELÀK, 1996).

Nos suínos, a infecção pelo BVDV pode acarretar reação cruzada e reações inespecíficas na detecção de anticorpos, sendo necessário o diagnóstico diferencial para peste suína clássica (BRASIL, 2004).

Em 1973, uma cepa de BVDV foi isolada pela primeira vez de suínos possibilitando demonstrar que esses animais podem se infectar naturalmente (FERNELIUS et al., 1973). Estudos descreveram que a prevalência de anticorpos contra BVDV atingiu 20-30% em algumas granjas suinícolas chinesas nos últimos anos (DENG et al., 2012).

O BVDV tem ampla distribuição em todas as regiões em que há criação de bovinos. Países livres de Peste Suína Clássica (PSC) estão detectando suínos soropositivos para pestivírus de ruminantes (ROEHE; BRITO, 2007). Existe possibilidade de que outros pestivírus sejam detectados em suínos, como o vírus Bungowannah, encontrado na Austrália em 2007 (KIRKLAND et al., 2007).

Em granjas com sistemas de creche e de dois sítios “wean-to-finish”, é comum a utilização de divisórias vazadas para separação dos lotes, limpeza e ventilação das baias (ABCS, 2014). Devido a este fato, infere-se o risco de

transmissão de patógenos, pois os suínos têm hábito frequente de fazer reconhecimento por meio do contato direto, ou seja, focinho a focinho.

No Brasil é comum a utilização da lâmina d'água no setor de terminação, para proporcionar controle térmico e bem-estar aos animais, sendo importante via de transmissão de agentes bacterianos e virais.

Devido ao pouco número de estudos a respeito das vias de transmissão do BVDV em suínos, especialmente pela lâmina d'água muito utilizada em granjas e pelo contato direto, devido à mistura de lotes e uso de divisórias que permitem esse contato entre os animais, o presente estudo investigou a infecção experimental pelo BVDV genótipo 1 em leitões desmamados e avaliou a possibilidade de transmissão do vírus pelas vias lâmina d'água e naso-nasal entre leitões desmamados.

2. Revisão de literatura

2.1. Agente etiológico

O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, que possui outros dois vírus antigenicamente relacionados: o VPSC e o BDV (HORZINEK, 1991; VILCEK; BELÀK, 1996).

O gênero *Pestivirus* compreende os vírus esféricos com 40 a 60 nm de diâmetro e nucleocapsídeo possivelmente icosaédrico, revestido externamente por um envelope derivado das membranas da célula do hospedeiro (WEBER, 2013; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

O BVDV apresenta dois biótipos: o citopático (cp) e o não-citopático (ncp), sendo que a principal diferença entre ambos está na capacidade de causar efeito citopático em células de tecidos ou de cultivo celular infectada (NAGAI et al., 2004; FLORES et al., 2005).

Os vírus ncp se replicam no interior das células hospedeiras, sem causar alterações morfológicas que levem a morte celular, diferente do cp (KÜMMERER et al., 2000). Os ncp constituem a maioria dos isolados de campo, e estão associados com as diversas manifestações clínicas da infecção, incluindo o surgimento de bezerros persistentemente infectados (PI), quando a infecção ocorre entre 40 e 120 dias de prenhez (RIDPATH; FLORES, 2012). Em contrapartida, os vírus cp são considerados uma mutação do biótipo ncp e por isso são menos comuns na natureza (FLORES, 2012).

Não existem evidências que comprovem haver relação entre a citopatogenicidade e a virulência, uma vez que cepas ncp do BVDV, em geral, causam a forma mais grave da enfermidade (RIDPATH et al., 2000).

O BVDV também se apresenta em dois genótipos, BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2, conforme propriedades antigênicas e análises filogenéticas (RADOSTITS et al., 2007). O BVDV-1 é responsável por infecções de caráter brando a moderado e são descritas como amostras clássicas do vírus ou cepas de referência (FLORES et al., 2000). Já o BVDV-2 ocasiona alta morbidade e mortalidade em bovinos, gerando

quadros de aborto, doença respiratória ou entérica aguda, doença hemorrágica e trombocitopenia (BRUM et al., 2013).

Os *Pestivirus* se diferenciam dos demais por codificar duas proteínas que não são encontradas nos outros vírus: proteína não-estrutural N^{pro} , que é codificada pelo primeiro gene da ORF, e a glicoproteína E^{ms} (Figura 1). A N^{pro} é uma proteinase que possui a função de se autoclivar da poliproteína após sua síntese. A E^{ms} (ou E0) é uma glicoproteína associada ao envelope viral e pode também ser secretada das células infectadas, possuindo também atividade de ribonuclease (FLORES, 2012).

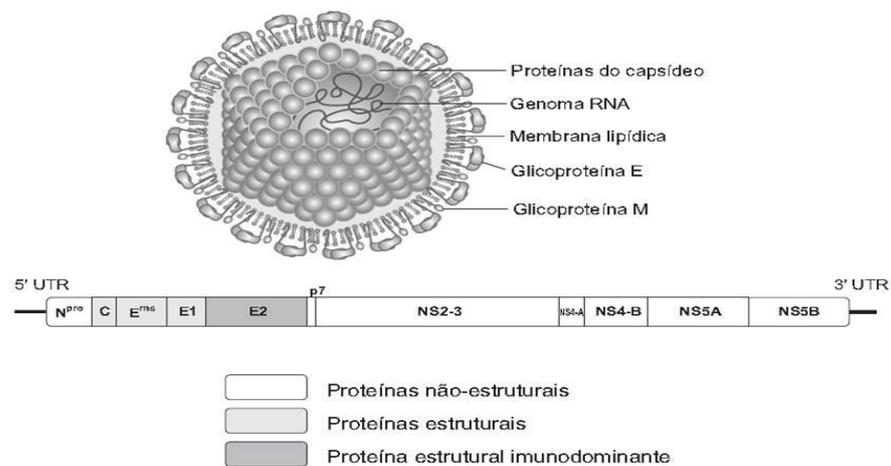


Figura 1. Esquema ilustrativo da morfologia do vírus da família *Flaviviridae* e da estrutura do genoma do gênero *Pestivirus*. Adaptada de Flores (2012).

Em bovinos a infecção por BVDV pode ocorrer de duas formas: a persistente, caracterizada pela imunotolerância a cepa viral infectante; e a transiente, em que há indução normal da resposta imune específica pelo hospedeiro (PETERHANS et al., 2003).

Na infecção transiente, não há imunotolerância e ocorre indução de dois tipos de resposta imune: a humoral (anticorpos) e a celular (células T), gerando imunidade protetora, porém não muito duradoura (PETERHANS et al., 2003; FULTON, 2013).

A resposta imune protetora se baseia no reconhecimento de dois principais antígenos do BVDV. A glicoproteína E^{ms} do envelope viral induz a produção de

anticorpos com atividade neutralizante limitada enquanto que a glicoproteína E2 também do envelope, é o principal antígeno indutor da produção de anticorpos específicos e de alta capacidade neutralizante (DONIS, 1995).

A glicoproteína E2 do envelope é a proteína dominante na geração de resposta imune pelo hospedeiro e os anticorpos produzidos para esse antígeno são essenciais para testes diagnósticos e para imunidade induzida por vacinas (JELSMA et al., 2013). De acordo com Sandvik (2005), a glicoproteína E2 do envelope é a principal responsável pela similaridade e diferença antigênica entre os pestivírus.

2.2. Epidemiologia

O BVDV tem distribuição mundial e a prevalência de anticorpos pode atingir 80% do rebanho bovino na América do Norte e em alguns países europeus (FLORES et al., 2005).

Estudos realizados por Deng et al. (2012), na China, entre 2007 e 2010, referiram a prevalência variando de 23,1% a 33,6% (MOENNING; LIESS, 1990). Na Áustria e Alemanha as taxas variam entre 3 e 40% (O'CONNOR et al., 1991). Na Polônia, Lipowski (2014) detectou prevalência variando de 0,1% a 1,04% em estudos realizados entre 2008 e 2011.

No Brasil, estudos conduzidos por Gatto (2015), entre 2013 e 2014, com 1930 amostras de frigoríficos encontrou prevalência de 5,34% entre os suínos do estado de São Paulo. Já Almeida (2015), em estudos realizados na região nordeste do Estado de São Paulo com 360 amostras de sangue suíno, entre 2014 e 2015, obteve 1,94% reagentes ao BVDV-1 e 3,06% reagentes ao BVDV-2.

Os pestivírus de ruminantes como o BVDV podem, em condições naturais, infectar hospedeiros de diferentes espécies como os bovinos, búfalos, ovinos, caprinos e suínos (ROEHE; BRITO, 2007). Os suínos são hospedeiros naturais do VPSC e eventuais de BVDV (MOENNIG, 2000), nos quais a mucosa oral ou nasal é a principal porta de entrada do BVDV no organismo (RADOSTITS et al., 2007).

Estudos epidemiológicos a soropositividade para BVDV em suínos (ROEHE et al. 1998), caprinos (CASTRO et al. 1994), ovinos (BRUM et al. 2002), bubalinos (PITUCO et al. 1998) e javalis cativos (FLORES et al. 2005), porém a relevância

epidemiológica da infecção em outras espécies de animais domésticos e silvestres ainda permanece incerta.

O contato direto entre bovinos de uma mesma propriedade é considerado o principal meio de transmissão do BVDV para suínos (VANNIER; ALBINA, 1999; MOENNIG; LIESS, 1990).

A transmissão também pode ocorrer devido ao uso de leite de bovinos infectados e outros derivados lácteos na alimentação de suínos, o uso de vacinas contra PSC contaminadas e fômites (CARBREY et al., 1976; TERPSTRA; WENSVOORT, 1997). Ao contrário do que se acreditava a transmissão também ocorre entre suínos, porém menos frequente (WIERINGA-JELSMA et. al., 2006).

A transmissão iatrogênica em bovinos pode ocorrer por meio de agulhas ou material cirúrgico contaminado, luvas de palpação, tatuadores, aplicadores de brincos, além da água, leite, sêmen, subprodutos cárneos e outros alimentos contaminados que também podem servir de veículos para a transmissão de agentes virais (TREMBLAY, 1996; FLORES, 2012).

2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Os primeiros sítios de replicação viral são as tonsilas, os tecidos linfoides e o epitélio da orofaringe. O BVDV induz necrose dos megacariócitos e linfócitos, consideradas alvos do vírus, prejudicando a função daquelas que sobrevivem à infecção (POTGIETER, 2004). Os bovinos eliminam o vírus através de descarga nasal, sendo que após 48-72 horas pós-infecção o vírus pode ser isolado no leite, na urina, nas fezes e na saliva. Entre o 5º e 8º dia pós-infecção ocorre à concentração viral máxima (MOSER, 2011).

A infecção pelo BVDV em suínos se comporta de maneira semelhante aos bovinos, principalmente na infecção de fêmeas reprodutoras na fase gestacional (BAKER, 1987). Porém os suínos infectados com BVDV apresentaram sinais clínicos ausentes ou infecções subclínica (DENG et al., 2012).

Nos suídeos as infecções por BVDV podem apresentar sinais clínicos semelhantes à PSC, tornando importante monitorar as infecções causadas por pestivírus de ruminantes (MOENNIG; LIESS, 1990; TAO et al., 2013).

Em animais adultos foram relatados problemas reprodutivos, nascimento de leitões fracos, abortamentos e mumificação fetal (VANNIER; ALBINA, 1999). Em porcas prenhes a infecção transplacentária pode causar abortamentos, natimortos, nascimento de leitegadas debilitadas, má formações e até o nascimento de leitões persistentemente infectados (BAKER, 1995).

Em leitões, a infecção por BVDV apresenta sinais clínicos como septicemia, hemorragia, tonsilite, icterícia, polisserosite, atrofia do timo, anemia, retardo no desenvolvimento, pelagem áspera, poliartrite, tremores congênitos, petéquias na pele, diarreia, conjuntivite e cianose de extremidades (TERPSTRA; WENSVOORT, 1997; ROEHE; BRITO, 2007).

Enfermidade gastroentérica ou respiratória, doença hemorrágica, perdas reprodutivas devido à infertilidade temporária, mumificações fetais, malformações, natimortos ou nascimento de animais fracos e inviáveis também são consequências da infecção pelo BVDV em suínos (RIDPATH; FLORES, 2012; O'SULLIVAN et al., 2011). Em estudos realizados por Santos (2016) no Brasil, avaliando a transmissão aerógena do BVDV, os leitões infectados apresentaram sinais clínicos como diarreia, emagrecimento e pelos ásperos.

3. REFERÊNCIAS

ABCS. **Associação Brasileira de Criadores de Suínos**. Produção de suínos: teoria e prática/coordenação editorial. Associação Brasileira de Criadores de Suínos; coordenação técnica da Integrall Soluções em produção animal. Brasília, DF, 908p. 2014.

ALMEIDA, H. M. S. **Epidemiologia e prevalência de infecções pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em suínos de criações não tecnificadas**. 2015. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - UNESP. Jaboticabal-SP.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, p. 425-445, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 47, de 18 de junho de 2004. **Regulamento técnico do programa nacional de sanidade suídea – PNSS.** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7938>. Acesso em: 11 mar 2015.

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

BRUM, M. C. S.; SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; BARROS, C. S. L.; LANGOHR, I. M. Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da diarreia viral bovina tipo 2 (BVDV-2). **Ciência Rural**, v. 32, p. 803-820, 2002.

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

CASTRO, R. S.; SILVA, F. A. G.; FRUTUOSO, E. M.; NASCIMENTO, S. A. Anticorpos contra pestivírus e herpesvírus em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, p. 577-578, 1994.

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

DONIS, R. O.; Molecular biology of the Bovine Viral Diarrhoea Virus and its interactions with the host. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, n. 3, p. 393-423, 1995.

FERNELIUS, A. L.; AMTOWER, W. C.; LAMBERT, G.; MCLURKIN, A. W.; MATTHEWS, P. J.; Bovine viral diarrhoea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. **Canadian Journal of Compared Medicine**, v. 37, p.13-20, 1973.

FLORES, E. F. In: _____. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFMS, p. 565-591, 2012.

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

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

FULTON, R. W. Host response to bovine viral diarrhoea virus and interactions with infectious agents in the feedlot and breeding herd. **Biologicals**, v. 41, p.31-38, 2013.

GATTO, I. R. H. **Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em suínos**. 2015. 76f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - UNESP. Jaboticabal-SP.

HORZINEK, M. C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, (Suppl.), v. 3, p. 1-5, 1991.

JELSMA, H.; LOEFFEN, W. L. A.; VAN BEUNINGEN, A., VAN RIJN, P. A. Preliminary mapping of non-conserved epitopes on envelope glycoprotein E2 of Bovine Viral Diarrhoea virus types 1 and 2. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p. 195-199, 2013.

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, n. 1, p. 26–34, 2007.

KÜMMERER, B. M.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; THIEL, H. J.; MEYERS, G. The genetic basis for cytopathogenicity of Pestiviruses. **Veterinary Microbiology**. v. 77, p. 117- 128, 2000.

LIPOWSKI, A. Serological study on bovine viral diarrhoea virus infection in pig population in Poland between 2008 e 2011. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.58, p.363-368, 2014.

MOENNIG, V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n.2-3, p. 93-102, 2000.

MOENNIG, V.; LIESS, B. Ruminant pestivirus infection in pig. **Revue scientifique et technique International Office of Epizootics OIE**, vol. 9, n.1, p. 151-161, 1990.

MOSER, A. P. **Reação Cruzada por Diarreia Viral Bovina Versus Peste Suína Clássica: Estudo de Caso**. Monografia Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

NAGAI, M.; HAYASHI, M.; SUGITA, S.; SAKODA, Y.; MORI, M.; MURAKAMI, T.; OZAWA, T.; YAMADA, N.; AKASHI, H. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. **Virus Research**, v.99, n. 2, p. 103-113, 2004.

O'CONNOR, M.; LENIHAN, P.; DILLON, P. Pestivirus antibodies in pigs in Ireland. **Veterinary Record**, v. 129, n. 12, p. 269, 1991.

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

PETERHANS, E.; JUNGI, T. W.; SCHWEIZER, M. BVD and innate immunity. **Biologicals**. v. 13, p.107-111, 2003.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. **Situação do BVDV na América do Sul**. Anais do Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Santa Maria, RS. Laboratório de Virologia, UFSM, p.49-57, 1998.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In:COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**, 2^a ed. v.2. Oxford University Press, 2004.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. **Veterinary Medicine**, 10th ed., Saunders-Elsevier, Edinburgh, 2156 p. 2007.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: ed. da UFSM, p. 565-591, 2012.

RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; FREY, M.; LANDGRAF, J. G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 145-155, 2000.

ROEHE, P.; BRITO, W. D. Infecções por pestivírus de ruminantes. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doença de Suínos**. 2ª ed. Goiânia: Cânone, p. 352-354, 2012.

ROEHE, P. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; MUÑOZ, J. C. P. **A situação do vírus da Diarreia Viral Bovina no País**. Anais do Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Santa Maria, RS. Laboratório de Virologia, UFSM, p.30-48. 1998.

SANDVIK, T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, p. 3-16, 2005.

SANTOS, A. C. R. **Infecção experimental para avaliar a excreção do vírus da diarreia viral bovina por leitões desmamados e transmissão viral por via aerógena**. 2016. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - UNESP. Jaboticabal-SP.

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

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

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. A congenital infections of Bovine Virus Diarrhoea Virus in Pigs: clinical, virological, and immunological observations. **Veterinary Quarterly**, v. 19, p. 97-101, 1997.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Medicine**, v.91, n.9, p. 858-866, 1996.

VANNIER, P.; ALBINA, E. Bovine Viral Diarrhea 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.; BELÁK, S. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. **Journal of Virological Methods**, v. 60, n.1, p. 103-108, 1996.

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

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

Capítulo II – TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA PELA VIA LÂMINA D'ÁGUA EM LEITÕES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO

Os suínos em condições naturais podem infectar-se com Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). Entretanto, as vias de transmissão entre suínos ainda não foram elucidadas. O objetivo do presente trabalho foi induzir a infecção experimental do BVDV-1 em leitões desmamados e avaliar a possibilidade de transmissão pela via lâmina d'água. Foram conduzidas duas réplicas do experimento (LD 1 e LD 2), para tal foram selecionados 12 animais comprovadamente livres de BVDV (n=6 por experimento realizado) para formar três grupos: controle, sentinelas e infectados, composto por dois animais cada grupo, sendo cada grupo alojado em isoladores construídos em aço inoxidável, projetados para estabelecer o contato entre os animais apenas pela via de transmissão em estudo, eliminando a possibilidade de contaminações externas. O grupo infectado recebeu um inóculo contendo BVDV-1, estirpe Singer, enquanto que os grupos controle e sentinela foram inoculados com meio E-MEM. Os animais permaneceram nos isoladores por 25 dias e durante esse período foram coletadas amostras de suabe nasal diariamente e sangue a cada sete dias e, ao final, os animais foram eutanasiados e necropsiados e realizada coleta de fragmentos de órgãos para histopatologia, imunohistoquímica e RT-PCR. No primeiro experimento (LD 1) os animais infectados excretaram partículas virais entre os dias 6 e 21 pós-infecção. No grupo sentinela a excreção ocorreu em apenas um animal, no 20º dia pós-infecção, e foi observada soroconversão no 25º dia de experimento. No LD 2, os animais infectados I3 e I4 excretaram partículas virais nos dias 4 e 21 pós-infecção, respectivamente. Apenas um animal sentinela (S3) apresentou excreção no 13º dia pós-infecção. Nos dois experimentos realizados não houve alterações macro e microscópicas dignas de nota. Assim, concluiu-se que os suínos podem se infectar com BVDV-1 excretando partículas virais e podendo dessa forma, transmitir o vírus a outros suínos pela lâmina d'água.

Palavras-chave: BVDV, pestivírus, suínos, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

Os Pestivírus possuem importância significativa na suinocultura, sendo os suínos hospedeiros naturais do vírus da peste suína clássica (VPSC), do vírus *Bungowannah* (KIRKLAND et al., 2007) e do Atypical Porcine Pestivirus (APPV) (HAUSE et al., 2015). Os suínos também atuam como hospedeiros eventuais do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e do Vírus da Border Disease (BDV).

Os suínos podem ser infectados pelo BVDV em condições naturais. Desta forma, surgiram alguns estudos a respeito da infecção causada por *Pestivirus* de ruminantes em suínos, principalmente pelo fato de tais infecções apresentarem alguns sinais clínicos semelhantes à peste suína clássica (PSC) (MOENNIG; LIESS, 1990).

As cepas do Vírus da Peste Suína Clássica (VPSC) são as mais adaptadas aos suínos e responsáveis por elevadas perdas econômicas. Porém, outros pestivírus como o BVDV, infectam os suínos, podendo haver confusões no diagnóstico sorológico, gerando falsos positivos (MOENNIG, 2000; VILCEK; BELÀK, 1996).

Estudos epidemiológicos referem os bovinos como principais hospedeiros do BVDV (RIDPATH, 2010). O contato direto com bovinos em uma mesma propriedade é considerado a fonte primária do aparecimento de infecções por BVDV em suínos (MOENNIG; LIESS, 1990).

Nos sistemas comerciais de criação de suínos no Brasil é comum encontrar no setor de terminação a lâmina d'água, utilizada para proporcionar condições de controle térmico e bem estar, sendo importante meio de transmissão de infecções bacterianas e virais (AMARAL et al., 2003; FLORES et al., 2005).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo induzir a infecção experimental ao BVDV-1 em leitões desmamados e avaliar a excreção e possível transmissão do vírus pela via lâmina d'água.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Neste estudo foram selecionados 12 leitões desmamados de linhagem comercial, com aproximadamente 21 dias de idade, apresentando bom escore corporal, com média de cinco quilos, provenientes da mesma leitegada, oriundo de granja comercial que possuía normas de biossegurança.

A seleção foi realizada após coleta de sangue dos leitões e da matriz doadora, para confirmação da higidez dos animais e ausência de anticorpos contra o BVDV por Virusneutralização (VN), conforme preconizado pelo “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals” (OIE, 2012). Os animais foram identificados com brincos, alimentados com ração e água autoclavada. A temperatura ambiente permaneceu constante em 25°C.

2.2 Isoladores

Para a avaliação da via de transmissão, foram utilizados isoladores de aço inoxidável (0,80m x 0,80m x 1,30m), do Laboratório de Pesquisa em Suínos, da FCAV – Unesp/Jaboticabal, SP, completamente fechados e especialmente projetados para estudos epidemiológicos, cujo modelo foi desenvolvido a partir de protótipo preconizado por Torremorell et al. (1997) e utilizados por Oliveira et al. (2006; 2007; 2010) (Figura 2 e 3).

O sistema dos isoladores possibilita que o abastecimento de ração e água seja realizado sem a necessidade de abertura do sistema, assim como para a colheita de amostras de suabe e sangue, no qual os materiais de coleta são introduzidos nos isoladores com auxílio de uma câmara de passagem.

Os isoladores dos animais infectados e sentinelas foram interligados por um sistema de mangueiras para transferência da água de uma lâmina para outra, sendo a única forma de contato entre os animais. A lâmina d'água foi renovada e transferida diariamente garantindo assim, que o grupo sentinela permanecesse em contato com a lâmina do grupo infectado.

A ventilação do sistema foi realizada por meio de fluxo de ar contínuo, sem retorno, por dutos estéreis que conectam os isoladores com a unidade ventiladora e a exaustora. Ambas as unidades, a exaustora (Exaustflow 500, Filtracom Ltda, Campinas, SP) e a ventiladora (Sterilflow 500, Filtracom Ltda) são equipadas com pré-filtros e filtros absolutos tipo HEPA, com 99,97% de eficiência para partículas de até $0,3 \mu\text{m}$.



Figura 2. Imagem de isoladores de aço inox projetados para estudos epidemiológicos de vias de transmissão em leitões. Laboratório de Pesquisa em Suínos, Jaboticabal, SP, 2016.

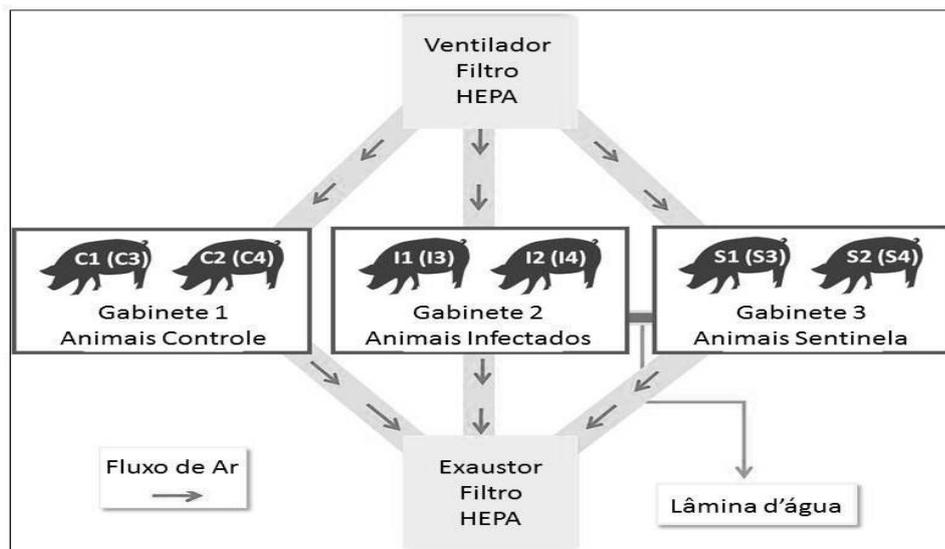


Figura 3. Representação esquemática de montagem dos isoladores para estudo da via de transmissão pela lâmina d'água. Jaboticabal, SP, 2016.

2.3 Delineamento experimental

Para realização da inoculação experimental com o BVDV-1, os leitões permaneceram em observação por sete dias em baias adequadas para a fase de criação e isoladas. Nesse período foram coletadas amostras de sangue e suabe nasal, as quais foram analisadas por Virusneutralização (VN) e RT-PCR (WEINSTOCK et al., 2001), comprovando que os animais estavam livres de infecção por BVDV.

Foram utilizados seis leitões por experimento, distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle, sentinela e infectado devido à capacidade de cada cabine, para avaliação da excreção e possível transmissão do BVDV-1, conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição de leitões por grupo para avaliação da transmissão do BVDV pela via lâmina d'água, em animais experimentalmente infectados. Jaboticabal, SP, 2015-2016.

Via de transmissão	ID	N de leitões infectados	N sentinela	N controle	Total por repetição
Lâmina d'água 1	LD 1	2	2	2	6
Lâmina d'água 2	LD 2	2	2	2	6

*ID: identificação dos experimentos, N: número de animais.

Os animais do grupo infectado foram inoculados com BVDV-1, da estirpe Singer. O inóculo foi produzido por meio da replicação viral em células da linhagem “*Madine Darby bovine kidney*” (MDBK) e posteriormente armazenado em meio Eagle-Minimal Essential Medium (E-MEM).

O inóculo utilizado apresentava título com média de $10^{5,78}$. A determinação do título foi realizada conforme o método proposto por Reed e Muench (1938).

A inoculação de BVDV nos leitões do grupo infectado seguiu o método preconizado por Cabezón et al. (2010). Foi realizada escarificação no focinho dos leitões e a inoculação no grupo infectado foi procedida por via intranasal, por instilação de 2,5 mL de suspensão viral em cada narina, e por via oral com uso de seringa, sendo administrado o volume de 5,0 mL. Nos grupos controle e sentinela, foram administrados 10 mL de placebo contendo meio E-MEM pelas mesmas vias.

Cada experimento foi conduzido durante 25 dias, período no qual foram colhidas amostras de suabe nasal diariamente e realizada a coleta de sangue a cada sete dias por venopunção jugular (Figura 4).

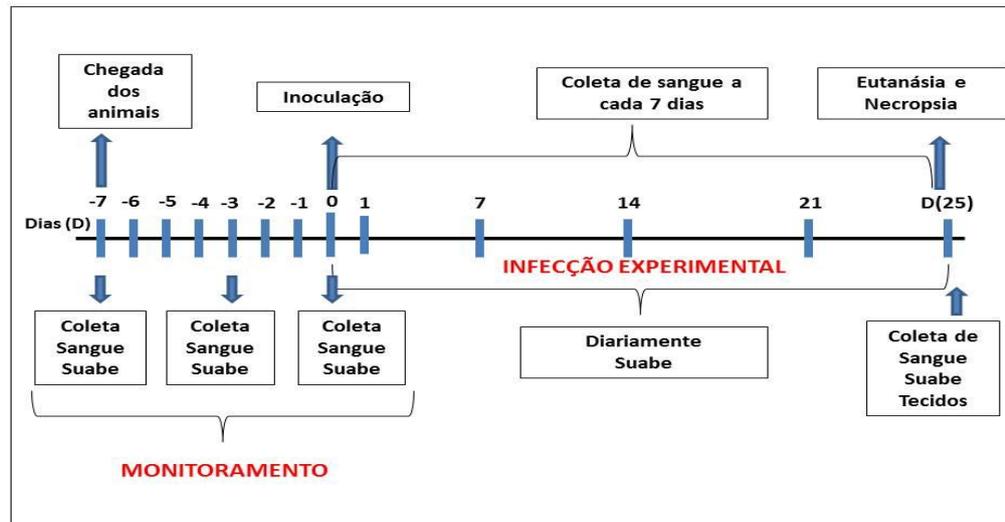


Figura 4: Representação esquemática da programação de colheita de amostras da chegada à eutanásia dos animais. Jaboticabal, SP, 2016.

No momento de cada coleta foi realizado o exame clínico geral do animal, com mensuração de temperatura retal e avaliação de sinais clínicos. No 25º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e necropsiados, ocasião na qual foram colhidas amostras de baço, íleo, linfonodo mesentérico, mediastínico e inguinal, pulmões, rim, fígado e tonsilas.

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da FCAV – Unesp/Jaboticabal, SP, (número de referência 07998/14, 08/05/2014).

2.4 Teste de Virusneutralização (VN)

As amostras de soro sanguíneo dos leitões foram submetidas ao teste de Virusneutralização. O soro a ser testado foi submetido a diluições sucessivas iniciando-se em 1:10 até 1:5.120 foram 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” (OIE, 2012). Para a realização do teste foram utilizadas células

epiteliais de rim bovino da linhagem “*Madine-Darby Bovine Kidney*” (MDBK) e como vírus padrão o BVDV-1 (estirpe Singer) citopático (CP). O título de anticorpos considerado para as amostras positivas foi equivalente à recíproca da maior diluição na qual ocorreu neutralização total das 100 TCID₅₀, aferido pela ausência de efeito citopático no tapete celular.

2.5 Histopatologia e Imunohistoquímica (IHQ)

Os fragmentos de baço, íleo, linfonodo mesentérico, mediastínico e inguinal, pulmão, rim, fígado e tonsilas foram fixados em formol tamponado 10% e rotineiramente processadas para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina-eosina (HE).

A técnica de IHQ foi realizada em todos os cortes histológicos, conforme descrito por Haines et al. (1992). As lâminas para IHQ foram silanizadas e submetidas à recuperação antigênica com protease XIV por 15 minutos. Posteriormente, realizou-se bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ 4%, bloqueio de ligação inespecífica com Kit comercial (DAKO LSAB + System – HRP Biotinylated Link Universal Streptavidin – HRP) e incubação com anticorpo monoclonal (VMRD, Inc., Pullman, USA) diluído em albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 1:150 aplicado por 14 a 16 horas (*overnight*) a 4° C, em câmara úmida.

No dia seguinte, realizou-se incubação com anticorpo secundário, revelação com diaminobenzidina (DAKO-Liquid DAB + Substrate, Chromogen System DAB + Chromogen DAB + Substrate Buffer) e contra-coloração com HE. Como controle positivo foi utilizado fragmento de epitélio de bovino, devidamente positivos para BVDV em todos os testes realizados.

2.6 RT-PCR

As amostras de suabe nasal e os fragmentos de baço, íleo, linfonodo mesentérico, mediastínico e inguinal, pulmão, rim, fígado e tonsila, foram avaliados quanto à presença de material genético do BVDV por RT-PCR. Os suabes coletados foram armazenados em microtubos estéreis, livres de RNAses, contendo 0,3 mL de E-

MEM (Eagle's Minimal Essential Medium) suplementado com antibióticos (estreptomicina 1%).

O RNA das amostras foi extraído utilizando-se Trizol (Sigma) e transcrito em cDNA pela utilização do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. A PCR convencional para identificação do vírus foi realizada utilizando-se o par de primers 103 (5'- TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC - 3') e 392 (5'- ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC - 3') que amplifica um produto de 290 pb (WEINSTOCK et al.,2001).

O produto de PCR obtido para a identificação dos genes foi utilizado para a reação de reamplificação utilizando o mesmo conjunto de primers, visando não gerar falsos negativos e aumentar a quantidade de produto amplificado empregando "primers" que se ligam à região altamente conservada do genoma do BVDV localizada na extremidade 5' não-traduzida da estirpe NADL que compartilha máxima homologia com os genótipos de BVDV tipo 1 e 2.

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

O produto da primeira PCR foi utilizado no lugar do cDNA para a realização da segunda PCR, que ocorreu sob as mesmas condições da PCR 1, utilizando-se o mesmo par de iniciadores. Em todas as reações foram utilizados controles positivos, contendo material genético do BVDV controle, e negativos, com ausência de material genético. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídeo (0,5 mg/mL), e visualizados por equipamento de fotodocumentação GelDoc XR (BioRad, Estados Unidos).

3. RESULTADOS

Foi observado que no experimento LD 1 houve infecção, pois os animais do grupo infectado excretaram e foi detectado presença de anticorpos contra BVDV. O animal infectado (I1) não apresentou soroconversão durante o período amostrado, porém houve detecção da excreção viral nos dias 5, 7, 8 e 24 pós-infecção. Já no animal I2 foram detectados anticorpos no 25º dia, com título igual a 20, e a excreção do material genético foi detectada nas amostras de suabe nos 6º, 12º, 15º e 20º dpi. Também foi possível demonstrar que houve a transmissão, pois o animal sentinela (S1) soroconverteu no último dia de experimento apresentando título de anticorpos igual a 20 e a excreção foi observada no 20º dpi. Os animais controle (C1 e C2) e sentinela (S2) foram negativos em todos os testes realizados. (Tabela 2).

Ao repetir o experimento lâmina d'água (LD 2), os resultados foram semelhantes, demonstrando que houve infecção no grupo dos animais infectados. O animal infectado (I4) apresentou excreção de material genético no 21º dpi e a soroconversão ocorreu no último dia (25º) de experimento, com título de anticorpos de 20. O outro animal infectado (I3) apresentou excreção no 4º dpi, contudo veio a óbito nove dias pós-infecção, sendo realizadas necropsia e coleta de fragmentos de tecidos, as amostras avaliadas foram negativas para BVDV por RT-PCR. Macro e microscopicamente não foi observada alterações significativas e os órgãos coletados foram negativos para RT-PCR. Foi possível observar também a transmissão do vírus, pois o animal sentinela S3 apresentou excreção no 13º dpi, não sendo detectada soroconversão.

Não foi detectada presença do RNA viral por RT-PCR nas amostras de todos os fragmentos de órgãos avaliados. Os animais controle (C) dos experimentos realizados foram negativos em todos os testes.

Tabela 2. Resultados obtidos pela RT-PCR e virusneutralização para detecção molecular e sorológica do BVDV em leitões detalhando o momento da excreção e da soroconversão. Jaboticabal, SP, 2015-2016.

Experimento		Excreção viral diagnosticada por PCR (dpi)	Título de anticorpos	Momento da detecção dos anticorpos (em dias)
LD I	Infectado (I1)	5, 7, 8, 24	-	-
	Infectado (I2)	6, 12, 15, 20	20	25 ^o
	Sentinela (S1)	20	20	25 ^o
	Sentinela (S2)	-	-	-
	Controle (C1)	-	-	-
	Controle (C2)	-	-	-
LD II	Infectado (I3)	4	-	-
	Infectado (I4)	21	20	25 ^o
	Sentinela (S3)	13	-	-
	Sentinela (S4)	-	-	-
	Controle (C3)	-	-	-
	Controle (C4)	-	-	-

*dpi: dia pós-infecção; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Na avaliação clínica foi possível observar no grupo infectado dos dois experimentos, sinais clínicos sugestivos de infecção pelo BVDV como diarreia, pelos arrepiados, descarga óculo-nasal a partir de 15 dpi, quando comparado aos animais controle, sendo similar ao início do período de excreção viral.

Na necropsia, os órgãos de todos os leitões avaliados não apresentaram lesões macroscópicas significativas. Em relação à avaliação microscópica nos tecidos recolhidos nos animais dos dois experimentos, não apresentaram lesões microscópicas quando comparados aos animais controle, demonstrando assim que o BVDV não foi capaz de determinar lesões nos órgãos avaliados. Além disso, na avaliação por IHQ não houve imunomarcagem positiva para BVDV nos tecidos avaliados.

Ao mensurar o pH da lâmina d'água os resultados encontrados foram: grupo controle média de $6,81 \pm 0,6$; sentinela média de $6,41 \pm 0,5$; e grupo infectado média de $6,96 \pm 0,3$.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo obteve sucesso na indução da infecção experimental em suínos utilizando-se o BVDV, pois houve a detecção da excreção do vírus e produção de anticorpos neutralizantes no grupo de animais inoculados. Foi observada também soroconversão dos animais sentinelas e detecção da excreção viral, o que comprova a transmissão do vírus pela lâmina d'água. Em ambos os grupos, inoculados e sentinelas, a excreção do vírus foi detectada antes da soroconversão.

A excreção do vírus pelos animais infectados teve início entre 5 e 10 dias pós-infecção, permanecendo até o final do acompanhamento dos animais por 25 dias. Nos animais sentinelas a excreção foi observada apenas uma vez, não sendo possível determinar nenhum padrão específico na excreção. Porém, sugere-se que seguiria o mesmo padrão observado no grupo de animais infectados.

Estudos realizados por Walz et al. (2004) detectaram anticorpos contra BVDV em porcas cinco semanas pós-infecção, enquanto Leforban et al. (1992) demonstraram que a soroconversão ocorreu três semanas após inoculação de suínos com uma cepa BDV.

Em consequência da dificuldade de acesso a cepas de BVDV isoladas de suínos no Brasil, o inóculo para este estudo foi replicado em sucessivas passagens em linhagem celular bovina (MDBK), permitindo sugerir que a patogenicidade e a virulência do vírus utilizado pode ter sido prejudicada, podendo também acarretar diminuição da quantidade de material genético excretado.

Em bovinos infecções agudas pelo BVDV estão relacionadas com a virulência da cepa, sendo que a disseminação de cepas de baixa virulência ocorre por meio do contato direto com bovinos PI, limitando a disseminação do vírus no rebanho. Em

relação a cepas de alta virulência, a disseminação do vírus ocorre semelhante ao VPSC, ou seja, a partir de animais com infecção aguda (RIDPATH; FLORES, 2012).

Em alguns surtos de BVDV já registrados em suínos foram relatados diarreia, anemia, pelo áspero, retardo no crescimento, petéquias cutâneas, gastroenterite crônica, lesões nos rins, imunossupressão, e descarga óculo-nasal (POTGIETER, 2004; TAO et al., 2013; CHASE, 2013). Dentre os sinais clínicos, a diarreia, o emagrecimento e a descarga óculo-nasal foram observados nos animais infectados nos dois experimentos, sendo que estes sinais surgiram logo após o início da excreção viral.

A presença do vírus nas secreções nasais dos animais infectados demonstra que os suínos podem atuar como fonte de infecção para outros animais, facilitando assim a disseminação no rebanho. O presente estudo constatou que leitões experimentalmente infectados pelo BVDV-1 excretaram o agente em diferentes dpi, mostrando que os suínos podem de fato amplificar e propagar o BVDV em rebanhos animais.

A utilização da lâmina d'água no setor de terminação contribui com a liquefação dos dejetos, sendo que esta liquefação poderia alterar o pH da água pela quantidade de excretas e dificultar a sobrevivência do vírus na água. Ao mensurar o pH da lâmina d'água, as médias encontradas por grupo foram: controle $6,81 \pm 0,6$; sentinela $6,41 \pm 0,5$; e infectado $6,96 \pm 0,3$.

O BVDV é estável na faixa de pH 5,7 a 9,3 com estabilidade máxima em pH 7,4 (HIRSH; ZEE, 2003). De acordo com o estudo realizado e os resultados obtidos com a mensuração diária do pH da lâmina d'água dos grupos demonstram que os valores estavam próximos a estabilidade máxima, possibilitando a viabilidade desse vírus na lâmina d'água e servindo como carreadora de patógenos como o BVDV, conforme observado neste estudo.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que suínos saudáveis são susceptíveis a infecção pelo BVDV, possibilitando a replicação e servindo de fonte de infecção para

outros suínos. Foi observado que a lâmina d'água comumente encontrada em granjas de suínos, pode veicular o BVDV de um suíno infectado para outro suíno.

6. REFERÊNCIAS

AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n.4, p. 510-514, 2003.

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

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

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

HAINES D. M.; CLARK E. G. & DUBOVI E. J. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in formalin- fixed, parafin-embedded tissues. **Veterinary Pathology**, v.29, p.27-32, 1992.

HAUSE, B. M.; COLLIN, E. A.; PEDDIREDDI, L.; YUAN, F.; CHEN, Z.; HESSE, R. A.; GAUGER, P. C.; CLEMENT, T.; FANG, Y.; ANDERSON, G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. **Journal of General Virology**, v.96, n.10, p. 2994-2998, 2015.

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, n.1, p.26-34, 2007.

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

MOENNIG, V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. **Veterinary Microbiology**, v.73, n.2-3, p.93-102, 2000.

MOENNIG, V.; LIESS, B. Ruminant pestivirus infection in pig. **Revue scientifique technique International Office of Epizootics OIE**, v. 9, n.1, p.151-161, 1990.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012**. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.03_PSC.pdf. Acesso em: 10 mar 2015.

OLIVEIRA, C. J.; GARCIA, T. B.; CARVALHO, L. F. O.; GIVISIEZ, P. E. Nose-to-nose transmission of *Salmonella Typhimurium* between weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v.125, n.3, p.355-361, 2007.

OLIVEIRA, C. J. B.; CARVALHO, L. F. O. S.; GARCIA, T. B. Experimental airborne transmission of *Salmonella Agona* and *Salmonella Typhimurium* in weaned pigs. **Epidemiology and Infection**, v.134, n.01, p.199-209, 2006.

OLIVEIRA, L. G.; CARVALHO, L. F. O. S.; MASSON, G. C. I. H.; FELICIANO, M. A. R. Infecção experimental por *Salmonella entérica* subespécie *enterica* sorotipo Panama e tentativa de transmissão naso nasal em leitões desmamados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1340-1347, 2010.

POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**, 2^a ed. v.2. Oxford University Press. 2004.

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

RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.1, p.105-121, 2010.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: ed. da UFSM, p. 565-591, 2012.

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

TORREMORELL, M.; PIJOAN, C.; JANNI, K.; WALKER, R.; JOO, H. S. Airborne Transmission of *Actinobacillus Pleuropneumoniae* and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Nursery Pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.8, n.58, p. 828-832, 1997.

VILCEK, S.; BELÁK, S. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. **Journal of Virological Methods**, v. 60, n.1, p.103-108, 1996.

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**, v. 51, p. 191-193, 2004.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of BVDV in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.343–346, 2001.

Capítulo III – TRANSMISSÃO PELA VIA NASO-NASAL DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM LEITÕES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO

Os suínos em condições naturais podem infectar-se com o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). Sabe-se que o principal meio de transmissão do BVDV em bovinos é o contato direto ou indireto com as secreções e excreções de animais infectados. Entretanto, as vias de transmissão entre suínos ainda permanecem desconhecidas. O objetivo deste estudo foi induzir a infecção experimental ao BVDV-1 (estirpe Singer) em leitões desmamados e avaliar a transmissão pela via naso-nasal. O experimento foi realizado com uma repetição para confirmação dos resultados (naso-nasal 1 e naso-nasal 2). Para tal, foram selecionados doze animais (n=6 por experimento), livres de BVDV para formar três grupos: controle (n=2), sentinela (n=2) e infectado (n=2). Os isoladores utilizados foram projetados para estabelecer o contato entre os animais apenas pela via sob estudo, eliminando outras vias de transmissão. Amostras de soro sanguíneo foram colhidas para sorologia (VN) e suabe nasal para RT-PCR. Ao final, os animais foram eutanasiados e colhidos fragmentos de órgãos para histopatologia e RT-PCR. Em todos os experimentos, os animais infectados apresentaram excreção de material genético e sinais clínicos como pelos arrepiados, porém a soroconversão não foi detectada no período estudado. Os animais controles e sentinelas mostraram-se negativos na VN e na RT-PCR. Assim, concluiu-se que o BVDV-1 pode infectar os suínos, excretar o vírus e gerar sinais clínicos, contudo não foi observada transmissão pela via naso-nasal durante o período avaliado.

Palavras-chave: BVDV, pestivírus, suínos, RT-PCR, isoladores.

1. INTRODUÇÃO

Os Pestivírus possuem importância significativa na suinocultura, sendo os suínos hospedeiros naturais do Vírus da Peste Suína Clássica (VPSC) e do vírus *Bungowannah*, e hospedeiros eventuais do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e do Border Disease (BDV). As cepas de Peste Suína Clássica (PSC) são as mais adaptadas aos suínos e são responsáveis por elevadas perdas econômicas. Porém, outros pestivírus como o BVDV têm sido relatados em suínos, podendo propiciar confusões no diagnóstico, visto que compartilham certa semelhança genética e antigênica (MOENNIG, 2000; VILCEK; BELÀK, 1996).

O BVDV pode infectar grande variedade de ruminantes domésticos e silvestres, além de suínos. Estudos confirmaram algumas espécies positivas para BVDV, caprinos (CASTRO et al., 1994), ovinos (BRUM et al., 2002), bubalinos (PITUCO et al., 1998) e javalis cativos (FLORES et al., 2005).

A transmissão do BVDV em bovinos pode ocorrer por contato direto ou indireto, com secreções contaminadas (BROCK et al., 1991; HOUE, 1995). Em bovinos a transmissão por aerossóis em distâncias curtas parece existir, porém a chance de ocorrer à infecção diminui à medida que a distância entre os animais aumenta (POTGIETER, 2004).

Em granjas com sistemas de creche e de dois sítios “wean-to-finish”, é comum a utilização de divisórias vazadas para separação dos lotes, limpeza e ventilação das baias (ABCS, 2014). Devido a este fato, infere-se o risco de transmissão de patógenos, pois os suínos no seu comportamento natural têm hábito frequente de fazer reconhecimento por meio do contato direto, ou seja, focinho a focinho.

Existe um número pequeno de estudos a respeito da epidemiologia, patogenicidade e sinais clínicos associados a infecções pelo BVDV em suínos. Diversas manifestações clínicas já foram relatadas, variando desde animais sem sinais clínicos até quadros agudos e fatais (RIDPATH et al., 1994; BAKER, 1995).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo induzir a infecção experimental do BVDV-1 em leitões desmamados e avaliar a excreção e possibilidade de transmissão do vírus pelo contato direto naso-nasal entre leitões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Neste estudo foram selecionados 12 leitões desmamados de linhagem comercial, com aproximadamente 21 dias de idade, apresentando bom escore corporal, com média de cinco quilos, provenientes da mesma leitegada, oriundo de granja comercial que possuía normas de biossegurança.

A seleção foi realizada após coleta de sangue dos leitões e da matriz doadora, para confirmação da higidez dos animais e ausência de anticorpos contra o BVDV por Virusneutralização (VN), conforme preconizado pelo “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals” (OIE, 2012). Os animais foram identificados com brincos, alimentados com ração e água autoclavada. A temperatura ambiente permaneceu constante em 25°C.

2.2 Isoladores

Para a avaliação da via de transmissão, foram utilizados isoladores de aço inoxidável (0,80m x 0,80m x 1,30m), do Laboratório de Pesquisa em Suínos, da FCAV – Unesp/Jaboticabal, SP, completamente fechados e especialmente projetados para estudos epidemiológicos, cujo modelo foi desenvolvido a partir de protótipo preconizado por Torremorell et al. (1997) e utilizados por Oliveira et al. (2006; 2007; 2010) (Figura 5 e 6).

O sistema dos isoladores possibilita que o abastecimento de ração e água seja realizado sem a necessidade de abertura do sistema, assim como para a colheita de amostras de suabe e sangue, no qual os materiais de coleta são introduzidos nos isoladores com auxílio de uma câmara de passagem.



Figura 5. Imagem de isoladores de aço inox projetados para estudos epidemiológicos de vias de transmissão em leitões. Laboratório de Pesquisa em Suínos, Jaboticabal, SP, 2016.

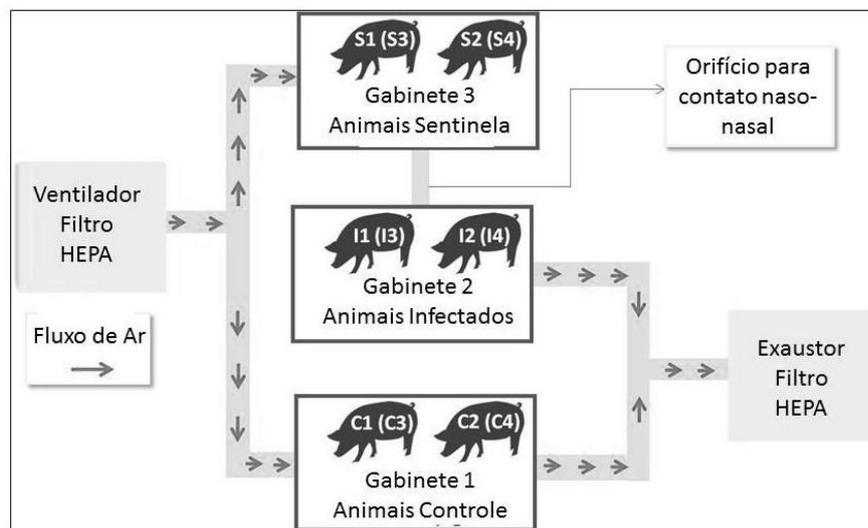


Figura 6. Representação esquemática de montagem dos isoladores para estudo da via de transmissão pelo contato naso-nasal. Jaboticabal, SP, 2016.

O sistema dos isoladores permite que o abastecimento de ração e água seja realizado sem a necessidade de abertura do sistema, assim como para a colheita de amostras de suabe e sangue, no qual os materiais de coleta são introduzidos no isolador com auxílio de uma câmara de passagem. Os isoladores dos animais infectados e sentinelas foram interligados por um orifício para que houvesse apenas o contato focinho-focinho, sendo a única forma de contato entre os animais (Figura 7).



Figura 7: Imagem do orifício para contato naso-nasal.

A ventilação do sistema foi realizada por meio de fluxo de ar contínuo, sem retorno, por dutos estéreis que conectam os isoladores com as unidades ventiladoras e exaustoras. Ambas as unidades, a exaustora (Exaustflow 500, Filtracom Ltda, Campinas, SP) e a ventiladora (Sterilflow 500, Filtracom Ltda) são equipadas com pré-filtros e filtros absolutos tipo HEPA, com 99,97% de eficiência para partículas de até 0,3 μm .

2.3 Delineamento experimental

Para realização da inoculação experimental com o BVDV-1, os leitões permaneceram em observação por sete dias em baias adequadas para a fase de criação e isoladas. Nesse período foram coletadas amostras de sangue e suabe

nasal, as quais foram analisadas por Virusneutralização (VN) e RT-PCR (WEINSTOCK et al., 2001), comprovando que os animais estavam soronegativos e não possuíam RNA viral para BVDV.

Foram utilizados seis leitões por experimento para avaliação da excreção e possível transmissão do BVDV-1 entre suínos, conforme demonstra a Tabela 3. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle, sentinela e infectado.

Tabela 3. Distribuição de leitões por grupo para avaliação da transmissão do BVDV pela via naso-nasal, em animais experimentalmente infectados. Jaboticabal, SP, 2015-2016.

Via de transmissão	ID	N de leitões infectados	N sentinela	N controle	Total por repetição
Naso-Nasal 1	NN 1	2	2	2	6
Naso-Nasal 2	NN 2	2	2	2	6

*ID: identificação dos experimentos, N: número de animais.

Os animais do grupo infectado foram inoculados com BVDV-1, da estirpe Singer. O inóculo foi produzido por meio da replicação viral em células da linhagem “*Madine Darby bovine kidney*” (MDBK) e posteriormente armazenado em meio Eagle-Minimal Essential Medium (E-MEM).

O inóculo utilizado apresentava título com média de $10^{6,17}$. A determinação do título foi realizada conforme o método proposto por Reed e Muench (1938).

A inoculação de BVDV nos leitões do grupo infectado seguiu o método preconizado por Cabezón et al. (2010). Foi realizada escarificação no focinho dos leitões e a inoculação no grupo infectado foi procedida por via intranasal, por instilação de 2,5 mL de suspensão viral em cada narina, e por via oral com uso de seringa, sendo administrado o volume de 5,0 mL. Nos grupos controle e sentinela, foram administrados 10 mL de placebo contendo meio E-MEM pelas mesmas vias.

Cada experimento foi conduzido durante 25 dias, período no qual foram colhidas amostras de suabe nasal diariamente e realizada coleta de sangue a cada sete dias por venopunção jugular.

No momento de cada coleta foi realizado o exame clínico geral do animal, com mensuração de temperatura retal e avaliação dos sinais clínicos. No 25º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e necropsiados, ocasião na qual foram colhidas amostras de baço, íleo, linfonodo mesentérico, mediastínico e inguinal, pulmão, rim, fígado e tonsilas.

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da FCAV – Unesp/Jaboticabal, SP, (número de referência 07998/14, 08/05/2014).

2.4 Teste de Virusneutralização (VN)

As amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao teste de Virusneutralização. O soro a ser testado foi submetido a diluições sucessivas iniciando-se em 1:10 até 1:5.120 foram 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” (OIE, 2012). Para a realização do teste foram utilizadas células epiteliais de rim bovino da linhagem *Madine-Darby Bovine Kidney* (MDBK) e como vírus padrão o BVDV-1 (estirpe Singer) citopático (CP). O título de anticorpos considerado para as amostras positivas foi equivalente à recíproca da maior diluição na qual ocorreu neutralização total das 100 TCID₅₀, aferido pela ausência de efeito citopático no tapete celular.

2.5 Histopatologia e Imunohistoquímica (IHQ)

Os fragmentos de baço, íleo, linfonodo mesentérico, mediastínico e inguinal, pulmão, rim, fígado e tonsilas foram fixados em formol tamponado 10% e rotineiramente processadas para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina-eosina (HE).

A técnica de IHQ foi realizada em todos os cortes histológicos, conforme descrito por Haines et al. (1992). As lâminas para IHQ foram silanizadas e

submetidas à recuperação antigênica com protease XIV por 15 minutos. Posteriormente, realizou-se bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ 4%, bloqueio de ligação inespecífica com Kit comercial (DAKO LSAB + System – HRP Biotinylated Link Universal Streptavidin – HRP) e incubação com anticorpo monoclonal (VMRD, Inc., Pullman, USA) diluído em albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 1:150 aplicado por 14 a 16 horas (*overnight*) a 4° C, em câmara úmida.

No dia seguinte, realizou-se incubação com anticorpo secundário, revelação com diaminobenzidina (DAKO- Liquid DAB + Substrate, Chromogen System DAB + Chromogen DAB+Substrate Buffer) e contra-coloração com HE. Como controle positivo foi utilizado fragmento de epitélio de bovino, devidamente positivos para BVDV em todos os testes realizados.

2.6 RT-PCR

As amostras de suabe nasal e os fragmentos de baço, íleo, linfonodo mesentérico, mediastínico e inguinal, pulmão, rim, fígado e tonsila, foram avaliados quanto à presença de material genético do BVDV por RT-PCR. Os suabes coletados foram armazenados em microtubos estéreis, livres de RNAses, contendo 0,3 ml de E-MEM suplementado com antibióticos (estreptomicina 1%).

O RNA das amostras foi extraído utilizando-se Trizol (Sigma) e transcrito em cDNA pela utilização do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. A PCR convencional para identificação do vírus foi realizada utilizando-se o par de primers 103 (5'- TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC - 3') e 392 (5'- ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC - 3') que amplifica um produto de 290 pb (WEINSTOCK et al.,2001).

O produto de PCR obtido Para a identificação dos genes foi utilizado para a reação de reamplificação utilizando-se o mesmo conjunto de primers, visando aumentar a quantidade de produto amplificado empregando “primers” que se ligam à região altamente conservada do genoma do BVDV localizada na extremidade 5' não-traduzida da estirpe NADL que compartilha máxima homologia com os genótipos de BVDV tipo 1 e 2.

O produto de PCR obtido para a identificação dos genes foi utilizado para a reação de reamplificação utilizando o mesmo conjunto de primers, visando não gerar falsos negativos e aumentar a quantidade de produto amplificado empregando “primers” que se ligam à região altamente conservada do genoma do BVDV localizada na extremidade 5’ não-traduzida da estirpe NADL que compartilha máxima homologia com os genótipos de BVDV tipo 1 e 2.

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

O produto da primeira PCR foi utilizado no lugar do cDNA para a realização da segunda PCR, que ocorreu sob as mesmas condições da PCR 1, utilizando-se o mesmo par de iniciadores. Em todas as reações foram utilizados controles positivos, contendo material genético do BVDV controle, e negativos, com ausência de material genético. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídeo (0,5 mg/mL), e visualizados por equipamento de fotodocumentação GelDoc XR (BioRad, Estados Unidos).

3. RESULTADOS

3.1 Soroconversão e excreção de material genético viral

Os resultados (Tabela 4) demonstram que no experimento naso-nasal 1 (NN1), houve soroconversão dos leitões infectados (I1 e I2) no 25^o dia pós-infecção (dpi), apresentando título de anticorpos de 80. Os leitões do grupo controle e sentinela não apresentaram soroconversão. Embora a presença de anticorpos tenha sido constatada apenas no último dia de experimento, a excreção do material genômico foi detectada nas amostras de suabe nasal, em um dos animais infectados (I2) por RT-PCR ao 17^o e 21^o dpi.

Em relação ao NN 2, a soroconversão foi detectada em apenas um dos leitões infectados (I3) no último dia de experimento, com título de anticorpos de 20. A excreção do vírus ocorreu nos dois animais infectados, sendo que o animal (I3) apresentou excreção ao 10^o, 11^o, 14^o, 15^o, 16^o e 18^o dias pós-infecção. Já nas amostras do animal (I4) a excreção nasal do vírus foi detectada ao 18^o, 19^o, 22^o e 23^o dias pós-infecção.

Os animais controle e sentinela dos experimentos realizados se mostraram negativos em todos os testes. Não foi detectada a presença do RNA viral por RT-PCR nas amostras de órgãos avaliadas.

Nos experimentos avaliados quando comparado aos animais controle, os animais infectados apresentaram sinais clínicos sugestivos de infecção pelo BVDV como diarreia e pelos arrepiados, a partir de 15 dias pós-infecção, coincidente com período de excreção viral.

Tabela 4. Resultados obtidos pela RT-PCR e virusneutralização para detecção molecular e sorológica do BVDV em leitões detalhando o momento da excreção e da soroconversão. Jaboticabal, SP, 2015-2016.

Experimento	Excreção viral diagnosticada por PCR (dpi)	Título de anticorpos	Momento da detecção de anticorpos (em dias)	
NN 1	Infectado (I1)	-	80	25 ^o
	Infectado (I2)	17, 21	-	-
	Sentinela (S1)	-	-	-
	Sentinela (S2)	-	-	-
	Controle (C1)	-	-	-
	Controle (C2)	-	-	-
NN 2	Infectado (I3)	10, 11, 14, 15, 16, 18	20	25 ^o
	Infectado (I4)	18, 19, 22, 23	-	-
	Sentinela (S3)	-	-	-
	Sentinela (S4)	-	-	-
	Controle (C3)	-	-	-

Controle (C4)	-	-	-
---------------	---	---	---

*NN 1: experimento naso-naso 1; NN 2: experimento naso-nasal 2; dpi: dia pós-infecção; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

3.2 Avaliação Histopatológica e Imunohistoquímica

Na necropsia, os órgãos de todos os leitões avaliados não apresentaram lesões macroscópicas dignas de nota. Em relação à avaliação histopatológica nos tecidos recolhidos nos animais dos dois experimentos, não apresentaram lesões microscópicas quando comparados aos animais controle, demonstrando assim que o BVDV não foi capaz de determinar lesões. Além disso, na avaliação por IHQ não houve imunomarcção positiva para BVDV nas amostras avaliadas.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo obteve sucesso na indução da infecção experimental de suínos utilizando-se a estirpe Singer do BVDV, uma vez que os animais soroconverteram. Os leitões inoculados excretaram o vírus antes da soroconversão ser detectada pela VN, entretanto a transmissão aos outros animais não foi detectada.

A excreção do vírus pelos animais infectados teve início dez dias pós-infecção, permanecendo até o final do experimento, embora não tenha sido possível determinar nenhum padrão específico na excreção de partículas virais. Diferente do que se encontra na literatura para a espécie bovina, a qual relata excreção em 48-72 horas pós-infecção (MOSER, 2011).

Em alguns surtos de BVDV em suínos já relatados foram descritos diarreia, anemia, pelos ásperos, retardo no crescimento, petéquias na pele, gastroenterite crônica, lesões nos rins, imunossupressão e descarga óculo-nasal (POTGIETER, 2004; TAO et al., 2013; CHASE, 2013). Dentre os sinais clínicos, diarreia e emagrecimento foram observados nos animais infectados dos dois experimentos, sendo que estes sinais surgiram logo após o início da excreção viral. Diante destes

sinais, o grupo de animais infectados apresentavam-se mais apáticos em comparação aos outros grupos, suspeitando assim, que esse fato pode ter dificultado o contato direto entre esses animais.

Os efeitos da infecção e a severidade dos sinais clínicos dependem de fatores como a cepa viral, imunidade do animal e surgimento de infecções secundárias. Em bovinos imunocompetentes há formação de anticorpos entre duas e três semanas pós-infecção, que são capazes de neutralizar o vírus e impedir que chegue aos órgãos-alvo (BROWNLIE, 2002).

As infecções agudas causadas pelo BVDV em bovinos estão relacionadas com a virulência da cepa, sendo que a disseminação de cepas de baixa virulência ocorre por meio do contato direto com bovinos PI, limitando a disseminação do vírus no rebanho. Em relação a cepas de alta virulência, a disseminação do vírus ocorre semelhante ao VPSC, ou seja, a partir de animais com infecção aguda (RIDPATH; FLORES, 2012).

Em consequência da dificuldade de acesso a cepas de BVDV isoladas de suínos no Brasil, o inóculo para este estudo foi replicado em sucessivas passagens em linhagem celular bovina (MDBK), permitindo sugerir que a patogenicidade e a virulência do vírus utilizado pode ter sido prejudicada.

A presença do vírus nas secreções nasais dos animais infectados demonstra que os suínos podem ser importantes fontes de infecção para outros animais, facilitando assim a disseminação no rebanho (POTGIETER, 2004; TAO et al., 2013). Este experimento constatou que leitões e experimentalmente infectados pelo BVDV-1 excretaram o agente em diferentes dias pós-infecção, mostrando que os suínos podem de fato amplificar o BVDV em rebanhos causando perdas econômicas significativas ao produtor.

Em bovinos a transmissão do BVDV ocorre por meio do contato direto ou contato indireto com secreções contaminadas (BROCK et al., 1991; HOUE, 1995). Geralmente durante as infecções agudas a viremia e excreção viral são transitórias e títulos baixos, porém podem resultar em transmissão viral (THURMOND, 2005).

Por outro lado, a transmissão do vírus de animais infectados pela via testada (contato direto naso-nasal) não ocorreu durante período experimental. Os resultados demonstram que houve intermitência na excreção do BVDV, que poderia dificultar o

contato direto no momento exato de excreção. Este fato corrobora os estudos conduzidos por Santos (2016) avaliando a transmissão aerógena do BVDV, os resultados demonstram que houve infecção no grupo de animais infectados, porém não foi detectada transmissão no período experimental.

Sendo assim, o sucesso na infecção de suínos no presente estudo utilizando uma cepa inicialmente isolada de bovina corrobora o fato encontrado na literatura de que a principal fonte de infecção para os suínos são os bovinos (RIDPATH, 2010), uma vez que o vírus de origem bovina foi capaz de infectar, induzir a produção de anticorpos e excretado pelo hospedeiro suíno.

5. CONCLUSÃO

Do ponto de vista epidemiológico, o presente estudo demonstrou que os suínos podem eliminar o vírus no meio ambiente e servir de fonte de infecção para espécies susceptíveis. A possibilidade de transmissão do BVDV pela via naso-nasal em leitões não foi provada dentro do período avaliado.

6. REFERÊNCIAS

ABCS. *Associação Brasileira de Criadores de Suínos*. Produção de suínos: teoria e prática/coordenação editorial. Associação Brasileira de Criadores de Suínos; coordenação técnica da Integrall Soluções em produção animal. Brasília, DF, 908p. 2014.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, p. 425-445, 1995.

BROCK, K. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 549-562, 1991.

BROWNLIE, J. **Bovine virus diarrhoea virus: pathogenesis and control**. *Proc. XXII World Buiatric Congress*. Hannover, p.24-30, 2002.

BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; TOBIAS, F. L.; PITUCO, E. M.; WINKELMANN, E. R. Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas prenhes imunizadas com duas amostras de vírus atenuadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p.64-72, 2002.

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

CASTRO, R. S.; SILVA, F. A. G.; FRUTUOSO, E. M.; NASCIMENTO, S. A. Anticorpos contra pestivírus e herpesvírus em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, p.577-578, 1994.

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

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

HAINES, D. M.; CLARK, E. G.; DUBOVI, E. J. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in formalin- fixed, parafin-embedded tissues. **Veterinary Pathology**, v. 29, p.27-32, 1992.

HOUE, H.; BAKER, J. C.; MAES, R. K.; WURYASTUTI, H.; WASITO, R.; RUEGG, P. L.; LLOYD, K. W. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody positive cattle among herds with different infection and vaccination status. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 321-326, 1995.

MOENNIG, V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n.2-3, p. 93-102, 2000.

MOSER, A. P. *Reação Cruzada por Diarreia Viral Bovina Versus Peste Suína Clássica: Estudo de Caso*. Monografia Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2011.

OIE. *Organização Mundial de Saúde Animal. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012*. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.03_PSC.pdf. Acesso em: 10 ago 2016.

OLIVEIRA, C. J.; GARCIA, T. B.; CARVALHO, L. F. O.; GIVISIEZ, P. E. Nose-to-nose transmission of *Salmonella Typhimurium* between weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v.125, n.3, p.355-361, 2007.

OLIVEIRA, C. J. B.; CARVALHO, L. F. O. S.; GARCIA, T. B. Experimental airborne transmission of *Salmonella Agona* and *Salmonella Typhimurium* in weaned pigs. **Epidemiology and Infection**, v.134, n.01, p.199-209, 2006.

OLIVEIRA, L. G.; CARVALHO, L. F. O. S.; MASSON, G. C. I. H.; FELICIANO, M. A. R. Infecção experimental por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Panama e tentativa de transmissão nasonasal em leitões desmamados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1340-1347, 2010.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do HVB-1 na América do Sul. **Anais Simp. Int. herpesvírus bovino e diarreia viral bovina**, p.49-57, 1998.

POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**, 2ª ed. v.2, 2004.

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

RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.1, p.105-121, 2010.

RIDPATH, J. 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.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: ed. da UFSM. p. 565-591, 2012.

SANTOS, A. C. R. **Infecção experimental para avaliar a excreção do vírus da diarreia viral bovina por leitões desmamados e transmissão viral por via aerógena**. 2016. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - UNESP. Jaboticabal-SP.

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

THURMOND, M. C. Virus Transmission. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**. Blackwell Publishing, Oxford, UK. p.91-104, 2005.

TORREMORELL, M.; PIJOAN, C.; JANNI, K.; WALKER, R.; JOO, H. S. Airborne Transmission of *Actinobacillus Pleuropneumoniae* and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Nursery Pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.8, n.58, p. 828-832, 1997.

VILCEK, S.; BELÁK, S. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. **Journal of Virological Methods**, v. 60, n.1, p. 103-108, 1996.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of BVDV in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 343–346, 2001.