

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

**DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE PERSISTENTEMENTE
INFECTADO EM LEITÕES NASCIDOS DE PORCAS
INFECTADAS COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA**

Felipe dos Santos Gomes

Médico Veterinário

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

**DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE PERSISTENTEMENTE
INFECTADO EM LEITÕES NASCIDOS DE PORCAS
INFECTADAS COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA**

Felipe dos Santos Gomes

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 (Patologia Animal)

2018

G633d Gomes, Felipe dos Santos
Determinação da condição de persistentemente infectado em
leitões nascidos de porcas infectadas com o vírus da diarreia viral
bovina/ Felipe dos Santos Gomes. – – Jaboticabal, 2018
xvi, 32 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Luís Guilherme de Oliveira
Banca examinadora: Simone Maria Massami Kitamura Martins,
Lizandra Amoroso
Bibliografia

1. BVDV 2. Neonatos suínos 3. RT-PCR 4. Pestivirus 5.
Transmissão transplacentária. 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 –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE PERSISTENTEMENTE INFECTADO EM LEITÕES NASCIDOS DE PORCAS INFECTADAS COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

AUTOR: FELIPE DOS SANTOS GOMES

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:



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



Profa. Dra. SIMONE MARIA MASSAMI KITAMURA MARTINS
Nutrição e Produção Animal / Instituição USP - Câmpus Pirassununga



Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de maio de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FELIPE DOS SANTOS GOMES – Nascido em 21 de maio de 1993, na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, é Médico Veterinário formado pela Universidade Estadual Paulista – UNESP – Câmpus de Jaboticabal – em 2016. Realizou o estágio curricular na Cooperativa Agroindustrial Consolata – COPACOL – na área de suinocultura, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. Em 2016, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista do CNPq, com o número de processo 130298/2018-2, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. O projeto obteve auxílio FAPESP, processo 2016/214212.

“Seja você quem for, qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma forma, você chega lá.”

Ayrton Senna

À minha família, pelo apoio e incentivo na minha decisão de realizar uma pós-graduação. À minha namorada, por estar comigo em todos os momentos dessa minha etapa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter concluído esta etapa. Muitas vezes as coisas pareciam tão difíceis, e foi no amparo de orações e de Deus que elas se tornaram mais simples. Obrigado por todas as conquistas que venho conquistando a cada ano da minha vida.

À minha família, por se fazerem presentes mesmo na distância. À minha mãe Nalú, pela dedicação e preocupação nesses sete anos em Jaboticabal. Ao meu pai Miguel, por toda a ajuda que me deu nesse período e pelos conselhos prestados. À minha irmã Luana, pelo companheirismo e amizade que temos um pelo outro.

À minha namorada Talita, por tudo que nós passamos nesses quase seis anos em Jaboticabal, pela amizade, companheirismo, horas e horas de estudos, pelo suporte nas horas difíceis. Sem dúvida, a melhor parte da faculdade vou levar em você.

À minha segunda família, a República Boate Azul. Meu obrigado a todos que passaram nesta casa nesse período. Tivemos muitos momentos de descontração e diversão. Levarei vocês onde eu estiver.

Aos meus amigos Lucas Mendonça e Anna Couto, pelo laço de amizade que criamos desde o primeiro dia de aula, há sete anos. Vocês também fizeram minha passagem nesta cidade algo mais especial. Muito obrigado a vocês.

A todos que me auxiliaram neste trabalho, em especial à Marina, que conduziu o experimento todo comigo, desde a parte experimental, passando pelas análises até a confecção deste trabalho. Obrigado por todo o conhecimento e ensinamento que me passou, pela amizade que criamos nestes dois anos. Com certeza, saio uma pessoa diferente e muito se deve a você. Agradeço também ao meu companheiro de república Acerola, pela ajuda nas colheitas de amostras e dedicação na sua iniciação científica, além da amizade nas horas de descontração.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisa em Suínos, por todo conhecimento e pesquisa que produzimos neste período, além dos momentos de confraternização e descontração.

À Andrea, do Laboratório de Viroses da Reprodução, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva por ter executado os testes de virusneutralização com todo cuidado e dedicação.

À Andressa, do Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo auxílio com os testes de biologia molecular.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial a Dra. Edviges Maristela Pituco e a Dra. Claudia Pestana Ribeiro, por disponibilizar o inóculo utilizado neste trabalho e pelo auxílio nos diversos diagnósticos.

Ao Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, que desde 2014 vem me ensinando, auxiliando e orientando. Devo muito ao senhor por tudo que sei, tanto na parte acadêmica quanto nos conselhos pessoais. Obrigado por toda preocupação e dedicação comigo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal por ter sido minha casa nos últimos anos. Agradeço pela excelente qualidade de ensino, por todos os professores de alto gabarito que eu tive honra de ter aula e pelas grandes amizades que fiz nesse período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro a este projeto (nº 2016/214212).

SUMÁRIO

	Página
Certificado Comissão de Ética para Experimentação Animal	xii
RESUMO	Xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	Xv
LISTA DE TABELAS	Xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
CAPÍTULO I – Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Agente etiológico	3
2.2 Epidemiologia	3
2.3 Desenvolvimento de animais persistentemente infectados (PI).....	5
2.4 BVDV em suínos.....	6
3. REFERÊNCIAS	8
CAPÍTULO II – Determinação da condição de persistentemente infectado em leitões nascidos de porcas infectadas com vírus da diarreia viral bovina.....	12
Resumo.....	12
Introdução	14
Métodos	16
Delineamento experimental (Instalações e animais)	16
Inóculo.....	17
Análises laboratoriais.....	17
Exame físico.....	17
Virusneutralização (VN).....	17
RT-PCR.....	18
Resultados.....	19
Discussão.....	23

Conclusão.....	25
Arquivos adicionais.....	26
Consentimento de publicação.....	26
Disponibilidade de dados e materiais.....	26
Conflito de interesse.....	27
Financiamento.....	27
Contribuição dos autores.....	27
Agradecimentos.....	27
Referências.....	28
Apêndices.....	32

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos em leitões nascidos de porcas infectadas pelo vírus da diarreia viral bovina", protocolo nº 22400/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2015.

Vigência do Projeto	01/01/2016 a 03/03/2018
Espécie / Linhagem	Suínos
Nº de animais	40
Peso / Idade	8 Kg / 35 dias
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Laboratório de Pesquisa em Suínos

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2015.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE persistentemente infectado EM LEITÕES NASCIDOS DE PORCAS infectadas COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

RESUMO: A infecção persistente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pode viabilizar a disseminação do vírus no rebanho, assim como interferir no controle da infecção. Ao mesmo tempo, em suínos, a presença de soropositivos para BVDV pode causar transtornos aos inquéritos sorológicos para a peste suína clássica (PSC). Este trabalho teve como objetivo determinar a condição de persistentemente infectado em leitões nascidos de porcas infectadas experimentalmente pelo vírus da diarreia viral bovina. Foram selecionadas seis porcas prenhes para este estudo que foram divididas em dois grupos, sendo um grupo inoculado com BVDV-2 (G1; n=4) aos 45 dias de gestação, e um grupo controle (G2; n=2). Foram realizadas avaliações clínicas nas porcas diariamente. Os neonatos foram monitorados durante 35 dias, em que foram realizadas avaliações clínicas rotineiras e colheita de suabes nasal dos leitões e de amostras de sangue venoso das porcas e dos leitões para obtenção de sangue total e soro a cada 72 horas. Foram realizados testes de RT-PCR para diagnóstico direto, e virusneutralização para avaliação sorológica. As porcas apresentaram soroconversão entre o 17º dia pós-infecção (dpi) e o 22º dpi, mas não foi detectada viremia. Nenhum leitão apresentou títulos de anticorpos ou viremia ao nascimento. Não ocorreu a transmissão transplacentária do vírus, portanto, não foi possível observar animais PI.

Palavras-chave: BVDV, neonatos, suínos, RT-PCR, pestivirus, transmissão transplacentária

DETERMINATION OF PERSISTENTLY INFECTED CONDITION OF PIGLETS BORN FROM GILTS INFECTED WITH BOVINE DIARRHEA VIRUS

Abstract: The persistently infection to bovine viral diarrhea virus (BVDV) can enable the spread of virus in the herd, as well as interfere in the control of infection. Concurrently, the presence of seropositive pigs may interfere with serological surveys for classical swine fever (CSF). This project aimed to determine the condition of persistently infected in piglets born from gilts infected with bovine viral diarrhea. BVDV-2 was inoculated in four pregnant gilts (G1; n=4), and a placebo was administered in two gilts, which were the control group (G2; n=2). Clinical evaluations were daily performed in the gilts. The newborns were monitored during 35 days, with clinical evaluation and whole blood, serum and nasal swabs sampling every 72 hours. RT-PCR and virus neutralization tests (VN) were performed. The gilts presented seroconversion between 17° dpi and 22°dpi, but no viremia was detected. No piglets presented antibody titers or viremia at birth. Transplacental transmission of the virus did not occur, therefore, PI animals could not be observed.

Keywords: BVDV, newborns, pigs, RT-PCR, *Pestivirus*, transplacental infection

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

cp: biótipo citopatogênico

CSFV: Classical Swine Fever

Dpi: Dia pós-infecção

E-MEM: Eagle Minimal Essential Medium

MDBK: Madine Darby Bovine Kidney

ncp: biótipo não citopatogênico

NRC: National Research Council

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

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Momento da soroconversão das fêmeas gestantes infectadas com BVDV-2 ao 45º dia de gestação, e seus respectivos títulos de anticorpos nas primeiras e últimas amostras reagentes. Jaboticabal, SP, 2017	20
Tabela 2. Número leitões nascidos de fêmeas gestantes infectadas com BVDV-2 no 45º dia de gestação, sororreagentes ao BVDV-2, e seus respectivos títulos de anticorpos, durante os 35 dias de colheita pós-nascimento. Jaboticabal, SP, 2017.....	23

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Títulos de anticorpos contra BVDV-2 nas leitegadas de fêmeas gestantes infectadas com o BVDV-2 no 45º dia de gestação, representados pelo percentual de animais sororreagentes de acordo com a respectiva titulação. Leitegadas 1, 2 e 3. Jaboticabal, SP, 2016.....	22

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

Dentre os gêneros virais da família *Flaviviridae*, podemos destacar o *Pestivirus*, que possui espécies de vírus de grande importância dentro da produção animal, dentre elas o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença das fronteiras (BDV). A espécie suína é capaz de se infectar com esses três vírus, e, por terem semelhança genética, pode ocorrer comprometimento dos exames diagnósticos e consequente falha nos programas de controle e erradicação destas enfermidades.

Em relação ao BVDV, a perpetuação do vírus em uma população é mantida de diversas formas, como a transmissão por contato direto (secreções nasais, oculares, leite, sêmen) ou indireta. A transmissão vertical também ocorre, e o nascimento de animais persistentemente infectados (PI) é considerado o responsável pela permanência do vírus em uma população.

Essa condição ocorre quando uma vaca prenhe é infectada no terço médio da gestação (40 a 120 dias) e o sistema imune do feto ainda não está completamente desenvolvido. O vírus, então, é reconhecido como próprio, tornando o feto imunologicamente tolerante. Portanto, animais PI são considerados cavalos de Tróia dentro de uma população, pois excretam grandes quantidades de vírus e ausência de anticorpos.

A infecção por BVDV em suínos de forma natural já foi relatada. Este vírus possui reação cruzada com o CSFV, pelo fato de serem do mesmo gênero. Por ser uma doença de notificação obrigatória e com grandes prejuízos para a suinocultura, a peste suína clássica possui programas de erradicação bem eficientes, mas que podem estar sujeitos a falhas, justamente por essa semelhança entre os vírus.

Atualmente há poucos estudos sobre características epidemiológicas do BVDV na espécie suína, pois grande parte dos estudos está concentrada na espécie bovina. Este trabalho visa determinar, por meio de inoculações experimentais, se o BVDV-2 é capaz de ser transmitido por via transplacentária e gerar animais PI, suas possíveis manifestações clínicas e patológicas na espécie suína, além de elucidar

características epidemiológicas do vírus, que poderão auxiliar em programas de controle e erradicação tanto para a diarreia viral bovina como para a peste suína clássica.

2. Revisão de literatura

2.1. Agente etiológico

O gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, possui espécies de vírus importantes na produção animal, como o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença das fronteiras (BDV) (BECHER, 2003). Os membros desse gênero possuem vírions pequenos de 40 a 60nm de diâmetro, com um nucleocapsídeo icosaédrico envoltos por um envelope lipídico (RIDPATH; FLORES, 2007), além de possuírem uma fita única de RNA simples como material genético (BAUERMANN et al., 2013).

Os vírus pertencentes a esse gênero são divididos em dois biótipos, os não-citopáticos (ncp) e os citopáticos (cp). Os biótipos ncp do vírus da peste suína clássica e o vírus da diarreia viral bovina tem capacidade de produzir infecções persistentes em suínos e bovinos, respectivamente. No caso do BVDV, essas infecções persistentes em bovinos ocorrem em fetos infectados entre 40 e 120 dias de prenhez. Os citopáticos são considerados uma mutação dos não-citopáticos e, por isso, são menos comuns na natureza (RIDPATH; FLORES, 2007).

Em relação ao BVDV, ele pode ser dividido em dois genótipos, o BVDV-1 e o BVDV-2. Ambos os genótipos apresentam semelhanças genéticas. No entanto, diferenças de virulência e patogenicidade também estão presentes entre os dois genótipos (RIDPATH, 2003). Os isolados de BVDV-1 são, em sua maioria, estirpes de baixa virulência, enquanto os vírus pertencentes ao genótipo 2 apresentam alta virulência, com surtos agudos e doença hemorrágica (FLORES, 2000; BRUM, 2013)

2.2 Epidemiologia

O BVDV tem como hospedeiro principal os bovinos, mas também é capaz de infectar outras espécies domésticas como, ovinos, caprinos e suínos, quanto silvestres (lhamas e alpacas) (GONDIM, 2006). A transmissão do vírus ocorre horizontalmente através do contato direto com secreções nasais, oculares e genitais. A transmissão vertical também ocorrer em fêmeas gestantes (THURMOND, 2005).

Nos suínos, a transmissão via lâmina d'água em infecções experimentais já foi relatada (NASCIMENTO, 2016).

A transmissão vertical em bovinos pode ter diversas consequências tanto para a fêmea quanto para o feto. Essas consequências estão diretamente relacionadas à data de infecção da fêmea. Infecções causadas antes dos 40 dias de gestação geralmente culminam em absorção embrionária, com a fêmea retornando ao cio, e morte fetal seguida de abortamento ou mumificação fetal (GROOMS, 2004). A infecção pelo BVDV entre os 100 e 150 dias de gestação causa o nascimento de animais com malformações, principalmente no sistema nervoso, com casos de hipoplasia cerebelar e tremor congênito decorrente de hipomielinização da medula espinhal. Infecções da fêmea no terço final de gestação não apresentam grandes consequências, com bezerros nascendo normais, sem excreção do vírus e soropositivos (RIDPATH; FLORES, 2007).

Quando a infecção da fêmea acontece entre os 40 e 120 dias de gestação, ocorre o desenvolvimento de animais persistentemente infectados. Esses animais são a principal fonte de introdução do vírus em um rebanho negativo, seja pela aquisição de touros PI's ou fêmeas gerando progênie PI (RIDPATH; FLORES, 2007).

Em bovinos, o BVDV tem uma prevalência mundial de 60% (LAZZARI, 2008). Em relação aos animais PI's, a porcentagem mundial fica entre 1 a 2% (HOUE, 2003). No Brasil, 47,7% de amostras sorológicas se mostraram positivas para o BVDV em diversos estados do país (PITUCO; DEL FAVA, 1998), comprovando a ampla difusão do vírus no rebanho brasileiro. Em alguns estados do país, a prevalência do vírus foi mais evidente, como Goiás, Minas Gerais, Paraíba e Rio Grande do sul, com 54,11%, 57,56%, 64,7%, e 74,7% de soroprevalência, respectivamente (SAMARA, 2004; THOMPSON, 2006; GUIMARÃES, 2001; SCHERER, 2002).

Nos suínos, a prevalência do BVDV se mostra mais baixa em estudos realizados em outros países. Os primeiros registros de infecção em suínos foram da década de 1960 (SNOWDON; FRENCH, 1968). Em fêmeas em idade reprodutiva, a soroprevalência para BVDV-1 foi de 2,5%, enquanto para animais de terminação, os anticorpos foram detectados em 0,42% das amostras (LOEFFEN, 2009). Em

diversos países, a prevalência do vírus variou de 3% a 40% (O'CONNOR, 1991; TERPSTRA; WENSVOORT, 1991; DENG, 2012b).

Gatto (2015) realizou estudos de prevalência em 1750 amostras de frigorífico entre 2013 e 2014 no Brasil, e observou 5,34% de amostras soropositivas para BVDV em sete estados brasileiros. Em outro estudo realizado na região nordeste do estado de São Paulo, Almeida (2015) obteve, em 360 amostras de sangue, 1,94% e 3,06% reagentes ao BVDV-1 e ao BVDV-2, respectivamente, entre 2014 e 2015.

2.3 Desenvolvimento de animais persistentemente infectados (PI)

A manutenção do BVDV em uma população é mantida principalmente por animais PI's. A geração desses animais ocorre quando a fêmea bovina prenhe se infecta no terço médio de gestação, isto é, entre os 40 e 120 dias (DUBOVI, 1998). Neste período, a imunocompetência do feto não está completamente desenvolvida. Portanto, o vírus é reconhecido como próprio, tornando o feto imunologicamente tolerante (BROCK, 2003). Dessa forma, os animais se comportam como cavalos de Tróia no rebanho, excretando altas titulações virais e não apresentando sorologia, dificultando os programas de controle e erradicação do vírus.

A infecção persistente pelo BVDV em bovinos só é possível por biótipos ncp do vírus. Essa característica é devida a capacidade do biótipo cp em causar lise celular, o que comprometeria o desenvolvimento fetal, levando a quadros de malformações fetais, morte e aborto (LIEBLER-TENORIO, 2005).

A replicação do BVDV em infecções fetais é realizada em células do sistema imune e, ocasionalmente, em células do sistema nervoso central (CHASE, 2004). Em infecções persistentes, o vírus inibe a síntese de altas quantidades de interferon- α , uma citocina responsável por estimular a apoptose de células infectadas pelo vírus. Dessa forma, não ocorre a produção de anticorpos contra o BVDV, não possibilitando a identificação de animais PI pela sorologia (SMIRNOVA, 2008).

Portanto, a presença de animais PI em rebanhos bovinos se torna um agravante para a perpetuação do vírus em uma população, visto que esses animais apresentam alta excreção viral, ausência de anticorpos e sem sinais clínicos característicos da infecção (CHARLESTON, 2001).

2.4 BVDV em suínos

Os primeiros relatos de infecção de BVDV em suínos são datados da década de 1960. Nesses casos, era observada uma infecção sem sinais clínicos, sendo esta atribuída a estirpes de baixa virulência do vírus da peste suína clássica, além de testes sorológicos mostrarem presença de anticorpos contra o CSFV. No entanto, foi provado que amostras sorológicas de BVDV e CSFV apresentavam reações cruzadas (WENSVOORT, 1989), sendo elas futuramente identificadas como positivas para anticorpos contra BVDV (TAO, 2013b).

Essa reação cruzada apresentada pelos vírus em testes sorológicos é um grande agravante no controle de ambas as doenças. No território brasileiro, a vacinação contra CSFV é proibida desde 1998 (BRASIL, 1998), e, em casos confirmados positivos para a doença, medidas sanitárias são adotadas, sendo obrigatório o sacrifício do rebanho (BRASIL, 1934). Portanto, a diferenciação correta das doenças através de outros testes laboratoriais é de extrema importância para a cadeia de produção suína, visto que os testes sorológicos de triagem não permitem a diferenciação sorológica dos agentes.

Devido à alta relação genética do BVDV com o CSFV, testes para a diferenciação antigênica dos pestivirus foram desenvolvidos (WENSVOORT, 1989), e, a partir disso, começou a ser elucidada a epidemiologia do BVDV em suínos.

O BVDV foi inicialmente introduzido em produções industriais através de vacinas contra o CSFV e a Doença de Aujeszky. Em um relato de infecção intrauterina, porcas gestantes foram vacinadas contra o CSFV com vacina contaminada com o BVDV e os fetos foram infectados (WENSVOORT, 1989; TAO, 2013a). No estudo de TAO et al. (2013b), foi detectado por meio de RT-PCR a presença de BVDV em 21,74% dos lotes de vacina para CSFV.

Em suínos, as infecções causadas por BVDV cursam, geralmente, sem sinais clínicos (CASTRUCCI, 1974; LEFORBAN, 1992; WALZ, 1999; WALZ, 2004). No entanto, alguns trabalhos relataram problemas reprodutivos em fêmeas adultas, semelhantes aos encontrados nas infecções pelo CSFV (ROEHE; BRITO, 2012), como nascimento de leitões de baixo peso e fracos, aborto, mumificação fetal e retorno ao cio (VANNIER; ALBINA, 1999).

Além disso, em infecções experimentais com fêmeas gestantes, foi relatada a transmissão por via transplacentária. Em um estudo onde fêmeas gestantes foram inoculadas com o BVDV no 35º e 45º dia de gestação por via intrauterina e intranasal, respectivamente, nove leitões nascidos das porcas infectadas pela via intrauterina e cinco nascidos dos animais infectados por via intranasal nasceram persistentemente infectado (PATON; DONE, 1994). Nesse mesmo trabalho, em uma das fêmeas, o diagnóstico de gestação realizado aos 42 dias revelou a presença de 14 fetos, mas no nascimento, a leitegada foi de apenas quatro filhotes. Outros trabalhos mostraram a ocorrência da infecção intrauterina, onde se conseguiu detectar o vírus em pelo menos um feto (KULCSAR, 2001, WALZ, 2004, MUÑOZ-GONZÁLEZ, 2015).

Em alguns casos, a infecção de suínos adultos com BVDV resultou em sinais clínicos também semelhantes a infecções causadas pelo CSFV (TAO, 2013b). Nessas ocasiões, as estirpes virais tinham um longo histórico de passagem na espécie suína, tornando-se mais adaptada (TERPSTRA; WENSVOORT, 1988). Os sinais observados nesses relatos foram: anemia, retardo no crescimento, refugagem de leitões, pelagem áspera, poliartrite, tremores congênitos, petéquias, diarreia, conjuntivite e cianose de extremidades (TERPSTRA; WENSVOORT, 1988).

Os bovinos são a maior fonte de infecção para os suínos. O histórico de soropositividade na espécie suína foi relacionado com criações próximas a fazendas de gado (PASSLER; WALZ, 2010). Além da transmissão via contato direto com os bovinos, a infecção pode ocorrer por contato indireto, através de leite e soro utilizados na alimentação de suínos (TAO, 2013b). No entanto, a alta prevalência sorológica observada no passado para a espécie suína vem reduzindo. Isso, possivelmente, está relacionado à tecnificação pela qual a suinocultura passou nas últimas décadas, diminuindo o contato com outras espécies, além do maior controle de qualidade na produção de vacinas, evitando a contaminação pelo vírus (BOLIN; MATTHEWS; RIDPATH, 1991).

A infecção de BVDV em suínos é algo pouco estudado. Ainda necessitam estudos na área para elucidar características epidemiológicas, patogênicas e clínicas do vírus na espécie suína.

3. REFERÊNCIAS

- BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Hobi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.25, n.1, p. 6-15, 2013.
- BECHER, P.; RAMIREZ, R. A.; ORLICH, M.; ROSALES, S. C.; KÖNIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMAYER, H.; THIEL, H. J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**. Waltham, v. 311,p. 96-104, 2003.
- BRASIL, 1934. Gabinete do presidente, Decreto nº 24.548 de 3 de julho de 1934. Aprova o regulamento do serviço de defesa sanitária animal, **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro, 14/07/1934.
- BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Portaria nº 201, de 15 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de mai. de 1998, Seção 1, p. 48.
- BOLIN, S. R.; MATTHEWS, P. J.; RIDPATH, J. F. Methods of detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, Columbia, v. 3, n. 3, p. 199-203, 1991.
- BROCK, K. V. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v.31. p. 133-135, 2003.
- 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.
- CASTRUCCI, G.; TITOLI, F.; RANUCCI, S.; CASTRO PORTUGAL, F. L.; CILLI, V.; PI, B. Study of the experimental infection of pigs with bovine viral diarrhoea (BVD) virus. **Bolletino dell'Istituto Sieroterapico Milanense**, Milan, v. 53, n. 5, p. 585–591, 1974.
- CHARLESTON, B.; FRAY, M. D.; BAIGENT, S.; CARR, B. V.; MORRISON, W. I. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. **Journal of General Virology**, v.82. p.1893-1897, 2001.
- CHASE, C. C. L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. A. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20. p95-114, 2004.

DENG, Y.; SUN, C. Q.; CAO, S. J.; LIN, T.; YUAN, S. S.; ZHANG, H. B.; ZHAI, S. L.; HUANG, L.; SHAN, T. L.; ZHENG, H.; WEN, X. T.; TONG, G. Z. High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 159, n. 3-4, p. 490-493, 2012b.

DUBOVI, E. J. Bovine viral diarrhoea virus. **Anais Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino e Vírus da Diarréia Viral Bovina**, Santa Maria, RS. p.1-19, 1998.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. Flaviviridae. In: FLORES, E. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 565-590, 2007.

GONDIM, A. C. L. O. **Diarréia viral bovina**. Brasília, 2006. 56f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Bovinos) – Universidade Castelo Branco, Brasília, DF.

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

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

KULCSAR GP, SOÓS L, KUCSERA L, GLAVITS AND V. PALFI. Pathogenicity of a bovine viral diarrhoea virus strain in pregnant sows: Short Communication. **Acta Veterinaria Hungarica** v. 49, p. 117-120, 2001.

LAZZARI, F. C., BARTHOLOMEI, L. & PICCININ, A. Diarréia Viral Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 6:10, 2008.

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 Vétérinaires**, London, v. 23, n. 1, p. 73-82, 1992.

LIEBER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. p.121-143.

MUÑOZ-GONZÁLEZ S, RUGGLI N, ROSELL R, PEREZ LJ, FRIAS-LEUPOREAU MT, FRAILE L, MONTOYA M, CORDOBA L, DOMINGO M, EHRENSPERGER F, SUMMERFIELD A, GANGES L. Postnatal persistent infection of classical swine fever virus and its immunological implications. **PLoS One**. v. 10, n. 5, p. e0125692, 2015.

NASCIMENTO, K.; MECHLER, M.; GATTO, I.; CARNIELLI, L. G.; SOUZA, A.; SANTOS, F.; OLIVEIRA, L. G. Evaluation of transmission of bovine viral diarrhoea virus by water line in experimentally infected pigs. In: **European Symposium of Porcine Health Management**, v. 9, p. 443, 2016.

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

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

PATON DJ, DONE SH. Congenital infection of pigs with ruminant-type Pestiviruses. **Journal of Comparative Pathology**, London. v. 111, 151-163, 1994.

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.

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.

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

ROEHE, P.; BRITO, W. D. Infecções por pestevírus de ruminantes. In: SOBESTIANSKY J.; BARCELLOS D. **Doenças dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Cânone Editorial, p. 959, 2012.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; & MOREIRA, S. P. G. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Sciences**, v.41, p. 369-403, 2004.

SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN; R.; KREUTZ, L. C.; DURR, J. W.; BRUM, L. P.; QUADROS, V. L. & LIMA, M. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 45-50, 2002.

SMIRNOVA, N. P.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; VAN CAMPEN, H.; AUSTIN, K. J.; HAN, H.; MONTGOMERY, D. L. Acute non-cytopathic bovine viral diarrhea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. **Virus Research**, v.132. n.1-2. p.49-58, 2008.

TAO, J.; LIAO, J.; WANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; ZHU, G. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.165, n. 3-4, p. 185-189, 2013a.

TAO, J. et al. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 165, n. 3, p. 185-189, Aug. 2013b.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, T. G. Bovine viral diarrhea virus infections in swine. **Tijdschr voor Diergeneeskunde**, Houten, v. 116, p. 943-948. 1991.

THURMOND, M. C. Virus Transmission. In: Goyal SM & Ridpath JF. (Eds), **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 91-104, 2005.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEY, T. P.; KANEENE, J. B.; MAES, R. K. Comparison of type I and type II bovine viral diarrhea virus infection in swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 119-123, 1999.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEY, T. P.; MAES, R. K. Experimental inoculation of pregnant swine with type I bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 51, n. 4, p. 191-193, 2004.

WENSVOORT, G. et al. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against Hog Cholera Virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 21, p. 9-20, Nov. 1989.

¹DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE PERSISTENTEMENTE INFECTADO EM
LEITÕES NASCIDOS DE PORCAS INFECTADAS COM O VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA

Felipe dos Santos Gomes¹, Marina Lopes Mechler¹, Igor Renan Honorato Gatto¹, Felipe
Ferreira Barbosa Pires¹, Mariana Costa e Silva Figueiredo¹, Andressa de Souza-Pollo¹, Samir
Issa Samara¹, Luís Guilherme de Oliveria^{1*}

*Autor de correspondência: luiz.guilherme@fcav.unesp.br

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Universidade
Estadual Paulista (UNESP) – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane,
s/n, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brasil.

Resumo

Introdução: A condição de persistentemente infectados (PI) ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pode viabilizar a disseminação do vírus no rebanho, assim como interferir no controle da infecção. Ao mesmo tempo, em suínos, a presença de soropositivos para BVDV pode causar transtornos aos inquéritos sorológicos para a peste suína clássica (PSC). Este trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência da condição de persistentemente infectado em leitões nascidos de porcas infectadas experimentalmente pelo BVDV. Foram selecionadas seis porcas prenhes divididas em dois grupos, sendo um grupo inoculado com BVDV-2 (G1; n=4) aos 45 dias de gestação, e um grupo controle (G2; n=2). Foram realizadas avaliações clínicas nas porcas diariamente. Os neonatos foram monitorados durante 35 dias, período em que foram realizadas avaliações clínicas rotineiras, colheita de suabes nasais dos leitões, e de amostras de sangue venoso das porcas e dos leitões para obtenção de sangue total e soro a cada 72 horas. Foram realizados testes de RT-PCR para diagnóstico direto em sangue e suabes, e virusneutralização para avaliação sorológica.

Resultados: As porcas apresentaram soroconversão entre o 17º dia pós-infecção (dpi) e o 22ºdpi, mas não foi detectada viremia. Nenhum leitão apresentou títulos de anticorpos ou viremia ao nascimento.

¹ Artigo formatado conforme as normas do periódico BMC Veterinary Research

Conclusão: A transmissão transplacentária do BVDV-2 não foi evidenciada, já que os animais nasceram livres do vírus, e, portanto, não se observou a condição de persistentemente infectado.

Palavras-chave: BVDV, neonatos, suínos, RT-PCR, pestivirus, transmissão transplacentária

60 **Introdução**

61 Nos sistemas de produção de suínos, bovinos e ovinos, podem-se citar as infecções virais
62 causadas por agentes do gênero *Pestivirus*, que trazem grandes prejuízos econômicos para o
63 setor. Atualmente são reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses*
64 (ICTV) três espécies deste gênero que podem infectar os suínos, o vírus da peste suína
65 clássica (CSFV), o da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) e o da doença das fronteiras
66 (BDV) [1]. Recentemente foi descoberto um novo pestivírus, denominado pestivírus suíno
67 atípico (APPV), capaz de levar leitões recém-nascidos ao quadro de tremor congênito [2, 3].

68 Os membros do gênero *Pestivirus* possuem vírions pequenos (40 a 60 nm de diâmetro) com
69 nucleocapsídeo icosaédrico envolto em envelope lipídico [4]. Possui como material genético
70 uma fita única de RNA, que está constantemente sofrendo mutações e recombinações
71 genéticas [5].

72 Existem dois biótipos conhecidos de pestivírus, os citopáticos (cp) e os não-citopáticos (ncp).
73 Os ncp são mais comumente encontrados no campo e capazes de produzir infecção persistente
74 em fetos. No caso do BVDV, essas infecções persistentes em bovinos ocorrem em fetos
75 infectados entre no terço médio da gestação. Já os cp são considerados uma mutação do
76 biótipo ncp e, por isso, são menos comuns na natureza [4]. A infecção persistente pode ser
77 estabelecida tanto pelo BVDV 1 quanto pelo BVDV 2 [6].

78 Em ruminantes, BVDV pode ser transmitido por contato direto ou indireto entre os animais. O
79 vírus pode ser eliminado por secreções nasais, oculares, genitais, orais, como leite, sêmen,
80 urina e fezes. A transmissão vertical é frequente em vacas prenhes [7]. Já em suínos,
81 observou-se transmissão do vírus via lâmina d'água em infecção experimental [8].

82 A existência de um animal persistentemente infectado (PI), em bovinos, é o principal fator na
83 disseminação natural do BVDV. A infecção do feto bovino com o biótipo ncp antes do

desenvolvimento da competência imunológica, isto é, antes do terço final de gestação, pode resultar na geração de um animal persistentemente infectado pelo BVDV por toda sua vida, já que o sistema imunológico do feto imaturo reconhece as proteínas virais como próprias. O animal PI torna-se imunologicamente tolerante ao BVDV, não produzindo anticorpos contra o agente, e, por meio deste, o vírus é mantido na população bovina [9]. Em suínos, o vírus da peste suína clássica se comporta de maneira semelhante, gerando leitões PI [10].

Entre as espécies, a eficiência com que o BVDV atravessa a barreira placentária e induz infecção persistente difere. Em bovinos, a taxa de infecção fetal e desenvolvimento de PI durante uma prenhez precoce é muito mais eficiente do que em outras espécies [11, 12]. Infecções persistentes podem ser observadas em pelo menos outras oito espécies, como ovelhas, cabras, alpacas, veados-de-cauda-branca, alce, rato, cabra-americana-da-montanha e suínos [13, 14]. Em suínos domésticos, a ocorrência de infecção fetal foi evidenciada apenas em 1 de 20 marrãs, e também em 1 de 43 neonatos nascidos de 4 marrãs [15, 16].

O CSFV se encontra estreitamente relacionado, tanto antigenicamente como geneticamente, com outros dois vírus desse gênero, o BVDV e o BDV. Os dois últimos vírus podem infectar os suínos, mesmo tendo os ruminantes como os hospedeiros primários [18].

A problemática deste trabalho é enfatizada em dois fortes argumentos. Em primeiro lugar, a infecção persistente em suínos ao BVDV pode interferir nos esforços de controle da infecção, e em segundo lugar, a presença de suínos soropositivos pode interferir com os esforços de erradicação da infecção ao CSFV, baseado na reação cruzada de anticorpos nos inquéritos sorológicos.

Transmissões verticais e suas diversas manifestações clínicas e clínico-patológicas em bovinos já foram descritas, mas faltam estudos com os suínos. Este trabalho pretende avaliar manifestações clínicas causadas pelo BVDV em neonatos nascidos de porcas infectadas

experimentalmente e verificar as características epidemiológicas em relação à infecção transplacentária e geração de animais PI.

Métodos

Delineamento experimental (Instalações e animais)

Todos os procedimentos realizados neste estudo seguiram o preconizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP-Jaboticabal/SP, e foi aprovado com protocolo 22400/15.

Para o procedimento experimental foram utilizadas seis fêmeas suínas em condições sanitárias adequadas, de linhagem comercial, nulíparas, com idade de 180 dias e peso entre 90 e 100 kg adquiridas de empresa especializada. As fêmeas foram vacinadas contra doenças reprodutivas (parvovirose, leptospirose e erisipela) e eram sorologicamente negativas para BVDV.

As marrãs foram alojadas nas dependências da FCAV/Unesp e ficaram em baias de gestação até o momento da reprodução. O grupo infectado foi alojado em local diferente do grupo controle, visando evitar infecção dos animais livres.

As fêmeas foram cobertas por monta natural, os animais receberam ração de acordo com a fase gestacional e a água foi oferecida *ad libitum*. O parto foi assistido para auxiliar o nascimento dos leitões, garantir os primeiros cuidados e evitar que os recém-nascidos ingerissem o colostro antes da primeira colheita de sangue.

As porcas prenhes foram divididas em dois grupos, sendo um o grupo infectado (G1; n=4) e o outro, o grupo controle (G2; n=2). O G1 foi inoculado com o BVDV-2 (ncp) aos 45 dias de gestação e o G2 recebeu uma solução placebo, contendo somente meio E-MEM (Eagles Minimal Essential Medium).

Inóculo

O grupo infectado recebeu uma solução viral contendo um isolado de BVDV -2 (BVDV SV 260, ncp) cedido pelo Instituto Biológico (IB/SAA-SP). O inóculo utilizado foi isolado de amostra de campo (BVDV SV 260, genótipo 2 ncp), proveniente de caso clínico em bovino [19 ,20], uma vez que ruminantes são a maior fonte de infecção para os suínos [21].

O inóculo foi testado em bezerro, o qual apresentou viremia e soroconversão. Os resultados deste teste estão representados no APÊNDICE A. A inoculação viral nas porcas foi realizada por via intranasal e oral, simulando a via natural de infecção. Foi realizada escarificação nasal com auxílio de uma agulha e, em seguida, foi administrada uma dose viral de $10^{5,5}$ TCID₅₀ de BVDV-2 em 15 ml de E-MEM, sendo 5 mL do inóculo instilados em cada narina, e 5 mL administrado por via oral, segundo cálculos do método de Cabezón et al. [22].

Análises laboratoriais

Exame físico

As porcas passaram por avaliação clínica diária após a inoculação até o momento do parto. Os leitões foram observados em relação às alterações físicas (cutânea, locomotoras, digestórias e respiratórias - Quadro 1 – Arquivos Adicionais) e a mensuração diária da temperatura retal.

Virusneutralização (VN)

Amostras de soro sanguíneo foram coletadas através de punção da veia jugular, tanto das porcas quanto dos leitões, armazenadas em tubo estéril com ativador de coágulo e divididas em duas alíquotas, que foram armazenadas em -20°C até o momento da realização do teste.. A coleta das porcas teve início no momento da inoculação e perdurou até o pré-parto, com intervalo de três dias. Já a coleta dos leitões foi realizada no momento do nascimento, antes da ingestão do colostro, até 35 dias de vida, com frequência de três dias por coleta.

As amostras foram submetidas ao teste de VN para a pesquisa de anticorpos contra o BVDV-2, conforme preconizado pelo “*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*” [24], exceto pelo fato de que foram processadas em duplicatas. No teste de VN, foram utilizadas células epiteliais de rim bovino da linhagem permanente “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK) e empregada a cepa citopatogênica (cp) do BVDV-2. Foram consideradas reagentes as amostras de soro sanguíneo que promoveram neutralização total de 100 TCID₅₀ do BVDV-2 a partir da diluição 1:10. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição em que foi verificada a neutralização viral.

RT- PCR

Para avaliação da presença do RNA viral no sangue foram realizadas coletas de sangue total, armazenados em tubo estéril, com EDTA, separados em duas alíquotas e congelado em temperatura de -80°C até o momento da realização do teste. As frequências de coleta foram iguais à virusneutralização, tanto para as porcas quanto para os leitões. Em relação à excreção viral, foram realizadas coletas de suabe nasal nos leitões, no momento do parto até 35 dias de vida. Os suabes nasais foram armazenados em microtubos graduados livres de DNAses e RNAses, contendo 500 µL de meio E-MEM, os quais foram armazenados a -80°C até serem testados.

O RNA das amostras foi extraído utilizando Trizol (Sigma) e transcrito em cDNA pela utilização do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. Para identificação do vírus nas amostras, foi utilizado 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 [23].

As reações de PCR foram compostas por tampão 1x (KCl 50mM, Tris-HCl 200mM pH 8,4); MgCl₂ 2mM; dNTP's 0,2mM, 1,0U de Taq DNA polimerase, 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 3 µL de produto da RT-PCR e água pura estéril para um volume final de 20 µL. Para a amplificação, utilizou-se um termociclador programado para realizar um ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 58°C e 40 segundos a 72°C, e para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a uma segunda amplificação utilizando-se o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Os produtos da segunda amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5mg.mL⁻¹) e padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), e após foram visualizados sob luz UV, em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad).

Resultados

Exame físico

Foram obtidos das duas fêmeas do grupo controle um total de 24 leitões. No grupo infectado, houve exclusão de uma leitegada devido à rejeição e agressividade da fêmea com os leitões. Portanto, das três fêmeas do grupo infectado totalizaram-se 45 leitões.

Em relação à avaliação física diária dos leitões, não foram encontradas alterações dignas de nota. A temperatura retal dos animais tanto do G1 como do G2 permaneceu entre 38,0°C e 39,5°C com uma média de 38,8°C e 38,6°C, respectivamente. Em relação à consistência das fezes, 12 leitões do G1 (26,6%) apresentaram fezes pastosas do 5º ao 12º dia de vida. No G2, essa condição foi observada em sete leitões (29,1%), do 6º ao 10º dia de vida.

Virusneutralização

As porcas do G1 apresentaram anticorpos neutralizantes entre o 17º dia pós-infecção (dpi) e 22ºdpi, com títulos de anticorpos contra BVDV-2 iniciais variando de 20 a 40, diminuindo para 10 a 20 no pré-parto (Tabela 1). Os animais do G2 foram negativos para a detecção de anticorpos.

Tabela 1 Momento da soroconversão das fêmeas gestantes infectadas com BVDV-2 ao 45º dia de gestação, e seus respectivos títulos de anticorpos na primeira e última amostras reagentes

Fêmea (G1)	Titulação inicial (dpi)	Titulação final (dpi)
1	20 (17º)	10 (65º dpi)
2	20 (20º)	10 (65º dpi)
3	40 (18º)	20 (65º dpi)
4	20 (22º)	10 (65º dpi)

*Dpi – Dia pós-infecção

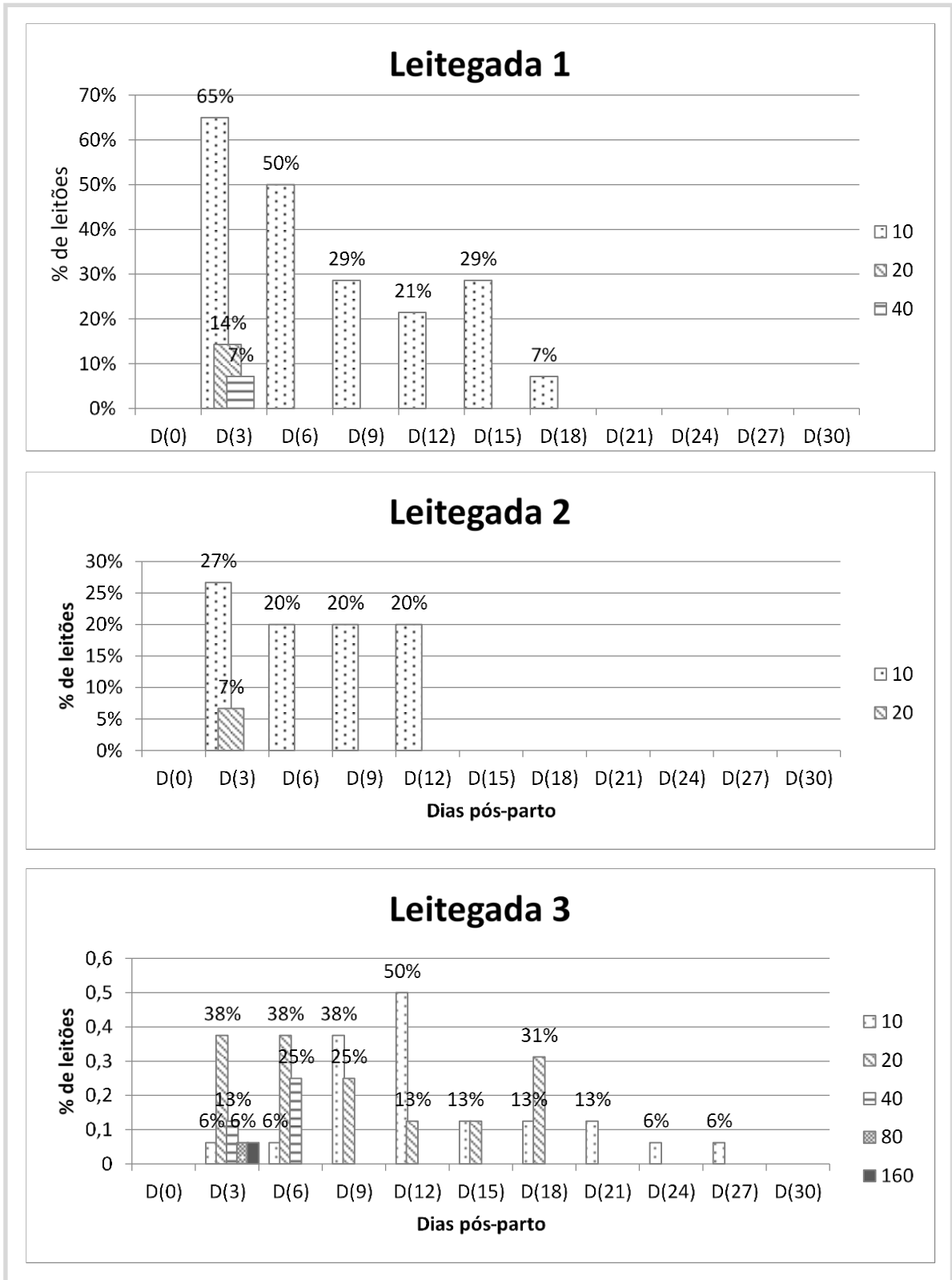
Nenhum leitão dos grupos G1 e G2 apresentou anticorpos contra o BVDV-2 ao nascimento (D0), sendo não reagentes no teste de VN. A partir da segunda colheita, parte dos leitões do G1 (62,2%) apresentaram diferentes títulos de anticorpos contra BVDV-2. Os títulos permaneceram até o 18º, 12º e 27º dia pós-parto nas leitegadas 1, 2 e 3, respectivamente. Essa titulação apresentada pelos leitões a partir da segunda coleta é oriunda da imunidade passiva colostrar. A Figura1 mostra as titulações de anticorpos contra BVDV-2 nos leitões durante os 35 dias do período experimental.

Na Fig.1, pode-se observar que as três leitegadas se comportaram de formas diferentes, algumas com títulos mais altos e mais duradouros, outras nem tanto. Na leitegada 1, no D(3), 85% dos leitões já possuíam alguma titulação de anticorpos, com títulos variando de 10 a 40. Observa-se que os títulos de anticorpos neutralizantes contra o agente decaíram nas colheitas posteriores, sendo o último título detectável no 18º dia pós-nascimento.

Na leitegada 2, a imunização dos leitões via colostro foi menos notável comparado com a leitegada 1. No D(3), cinco leitões apresentaram títulos variando de 10 a 20. A imunização passiva dessa leitegada permaneceu até o D(12), em que três leitões (20%) ainda se apresentavam reagentes ao antígeno (título de 10).

A imunização da leitegada 3 foi a mais eficiente quando comparada às outras duas, em que os leitões apresentaram as titulações mais altas. No D(3), 11 leitões (68%) apresentavam anticorpos contra BVDV-2 no soro, com um leitão (6%) com título de 160, um leitão (6%) com título de 80, dois leitões (13%) com 40, seis leitões (38%) com 20 e um leitão (6%) com título de 10. Os leitões apresentaram anticorpos até o 27º dia de vida, em que um leitão apresentava título de 10. Esta leitegada é nascida da Fêmea 3, que obteve os maiores níveis de anticorpos durante a gestação (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra quantidade de leitões sororreagentes das três leitegadas avaliadas durante os 35 dias de colheita. Nela, pode-se observar a duração da imunização via colostro.



241

242

243

244

Figura 1 Títulos de anticorpos contra BVDV-2 nas leitegadas de fêmeas gestantes infectadas com o BVDV-2 no 45º dia de gestação, representados pelo percentual de animais sororreagentes de acordo com a respectiva titulação. Leitegadas 1, 2 e 3

Tabela 2 Número leitões nascidos de fêmeas gestantes infectadas com BVDV-2 no 45º dia de gestação, sororreagentes ao BVDV-2, e seus respectivos títulos de anticorpos, durante os 35 dias de colheita pós-nascimento

Dias de coleta pós-nascimento													
Titulação	D0	D3	D6	D9	D12	D15	D18	D21	D24	D27	D30	D33	D35
0	45	17	24	28	29	38	37	43	44	44	45	45	45
10	0	14	11	13	14	5	3	2	1	1	0	0	0
20	0	9	6	4	2	2	5	0	0	0	0	0	0
40	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	45	28	21	17	16	7	8	2	1	1	0	0	0

RT-PCR

Não foi detectado antígeno viral por RT-PCR nas amostras de sangue das marrãs durante a gestação. No que diz respeito aos leitões, as amostras de sangue e suabe analisadas durante os 35 dias de colheita também foram negativos na RT-PCR.

Nenhum leitão apresentou sinais de infecção persistente (sorologia negativa e viremia positiva). As amostras de animais do grupo controle foram negativos em todos os testes.

Discussão

Ao contrário do que se observa em ruminantes, este estudo mostra que a infecção de marrãs com BVDV-2 no terço médio da gestação não foi capaz de levar ao nascimento de leitões persistentemente infectados, já que nenhum leitão apresentou viremia ou excreção do agente viral durante o período experimental.

A infecção congênita de leitões nascidos de porcas infectadas com BVDV já foi relatada em alguns estudos [25, 26, 27, 28]. A maioria dos trabalhos reportou que os leitões iam a óbito entre

a 2^a e a 16^a semana de vida, com sinais semelhantes ao da PSC, além de apresentarem retardo no crescimento. No presente estudo, os leitões nascidos das porcas infectadas não apresentaram sinais clínicos de peste suína clássica, como também não foi observada nenhuma alteração clínica digna de nota, discordando dos resultados de estudos anteriores.

Em alguns estudos com infecção de BVDV em porcas gestantes foi possível observar a infecção na fêmea, com viremia e sorologia positivas. Stewart et al. [15] inocularam BVDV via intranasal e oral em 20 porcas gestantes, e observaram soroconversão das fêmeas ao 21^o dia pós-infecção, assim como observado em outros estudos da literatura [29, 30], corroborando com o encontrado no presente estudo. No entanto, estes autores encontraram viremia nas porcas gestantes no 7^o dpi, o que não foi evidenciado nesse estudo. Walz et al. [16] realizaram trabalho semelhante, em que quatro porcas com 65 dias de gestação foram inoculadas por via intranasal com BVDV-1. Assim como Stewart et al. [15], todas as porcas apresentaram viremia entre o 5^o e o 7^o dpi. A não detecção de viremia nas marrãs experimentalmente infectadas neste trabalho pode ser resultado do caráter transitório da viremia do BVDV em suínos, e também pela pouca adaptação do vírus utilizado à espécie suína.

A infecção do BVDV em suínos jovens pode ocorrer sem manifestação clínica da doença [16, 31, 32, 33]. Outros autores relataram aparecimento de problemas reprodutivos em porcas prenhes, como abortos, nascimento de leitões pequenos, natimortos e animais persistentemente infectados (PI) [1, 34]. Neste trabalho, as porcas inoculadas não apresentaram sinal clínico e mantiveram a gestação sem complicações, assim como observado por Pereira et al. [35].

Em relação aos leitões, a viremia não foi detectada, a sorologia foi negativa ao nascimento e a excreção do vírus via nasal também não foi identificada, evidenciando que não houve transmissão transplacentária. A disseminação sistêmica do vírus na fêmea pode não ter sido

suficiente para vencer a barreira transplacentária [36], possivelmente pela baixa adaptação do vírus à espécie suína. Portanto, não houve o nascimento de animais PI.

A geração de animais PI é comumente vista em bovinos [9] e caprinos [37, 38]. Nos suínos, a essa ocorrência é mais rara. Paton e Done [34] infectaram experimentalmente porcas no 35º e 45º dias de gestação, pela via intrauterina e intranasal, respectivamente. Nove leitões nascidos de porcas da via intrauterina e cinco da via intranasal nasceram persistentemente infectados. Outros trabalhos também evidenciaram a infecção transplacentária, sendo o vírus isolado em pelo menos um dos fetos [10, 16, 39]. Todos estes trabalhos contrastam com os resultados observados no presente estudo.

A imunidade passiva da porca para os leitões se mostrou eficiente apesar das diferenças sorológicas encontradas de uma leitegada para outra, e perdurou em média até o 20º dia pós-parto. Essas diferenças na transferência da imunidade passiva colostrar resultam de características individuais de resposta imunológica das porcas contra o agente viral, além da capacidade absorviva de cada leitão. A queda nas imunoglobulinas séricas dos leitões estudados é considerada fisiológica, e pode ter seu declínio iniciado cerca de 15 dias pós nascimento [40, 41], o que foi observado também neste trabalho.

Conclusão

Este estudo evidenciou que a transmissão transplacentária do BVDV-2 não foi observada em fêmeas infectadas no terço médio da gestação, já que os leitões não apresentaram viremia ao nascimento, e não houve excreção nasal do vírus. Os anticorpos presentes nos recém-nascidos foram resultantes de transferência passiva colostrar, a qual apresentou variações entre as leitegadas. Desta forma, não foi observada a condição de persistentemente infectados em suínos experimentalmente infectados.

312

313 **Arquivos adicionais**

314 Ficha para avaliação clínica diária dos recém-nascidos até os 35 dias de idade.

AVALIAÇÃO FÍSICA		
ALTERAÇÕES	SIM	NÃO
PELE		
Lesões cutâneas		
Cianose		
Fragilidade vasos sanguíneo (punção)		
LOCOMOTOR		
Aumento volume nas articulações		
Claudicação		
Lesões de casco		
DIGESTÓRIO		
Vômito		
Fezes		
• Firme		
• Pastosa		
• Líquida		
RESPIRATÓRIO		
Tosse		
Espirro		
Descarga nasal		
GERAL		
Temperatura corporal (retal)		
Apático		
Letárgico		

315

316 **Consentimento de publicação**

317 Não aplicável.

318

319 **Disponibilidade de dados e materiais**

320 Todos os dados gerados ou analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo e seus

321 arquivos de informações complementares.

322

323

Conflitos de interesse

Não há conflitos de interesse.

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2016/ 21421-2).

Contribuição dos autores

FSG e MLM conduziram todo o experimento e processamento de amostras, além da confecção do artigo. IRHG idealizou o projeto e auxiliou na parte experimental. MCSF e FFBP auxiliaram durante todo o período experimental e colheita de amostras. ASP foi responsável pelo treinamento laboratorial e processamento dos resultados de RT-PCR. SIS e LGO auxiliaram na confecção do projeto e orientaram quanto ao delineamento experimental e condução do trabalho, além de auxílio na confecção do artigo.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo (130298/2018-2) e à FAPESP pela concessão do auxílio à pesquisa (2016/21421-2). Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial a Dra. Edviges Maristela Pituco e a Dra. Claudia Pestana Ribeiro, pela concessão do inóculo e auxílio na realização de testes laboratoriais. Ao Laboratório de Viroses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV, em especial a Andrea Souza Ramos de Medeiros, pela realização dos testes de virusneutralização. Ao Laboratório de Pesquisa em Suínos e à FCAV pela possibilidade de realização deste trabalho.

Referências

1. Becher P, Ramirez RA, Orlich M, Rosales SC, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeier H, Thiel HJ. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*. Waltham, 2003; 311:96-104.
2. Hause B, Collin EA, Peddireddi L, Yuan F, Chen Z, Hesse RA, et al. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the United States. *J Gen Virol*. 2015; 96:2994-2998.
3. Gatto IRH, Harmon K, Bradner L, Silva P, Linhares DCL, Arruda PH, Arruda BL. Detection of atypical porcine pestivirus in Brazil in the central nervous system of suckling piglets with congenital tremor. *Transbound Emerg Dis*. 2018; 00:1-6.
4. Flores EF, Ridpath J. Flaviviridae. In: FLORES, E. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM. 2007; 565-590.
5. Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R, Flores EF. Hobi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J Vet Diagn Invest*. 2013; 25:6-15.
6. Liebler-Tenorio EM. Pathogenesis. In: GOYAL SM, RIDPATH JF. *Bovine viral diarrhea virus*. Iowa: Blackwell Publishing. 2005; 7:121-143.
7. Thurmond MC. Virus Transmission. In: Goyal SM & Ridpath JF. (Eds), *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 2005;91-104.
8. Nascimento K, Mechler M, Gatto I, Carnielli LG, Souza A, Santos F, Oliveira LG. Evaluation of transmission of bovine viral diarrhea virus by water line in experimentally infected pigs. In: *European Symposium of Porcine Health Management*, 9. 2017;443.
9. Dubovi EJ. Bovine viral diarrhea virus. In: *SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVIRUS BOVINO E VIRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA*. 1998; Santa Maria. Anais;1-19.
10. Muñoz-González S, Ruggli N, Rosell R, Perez LJ, Frias-Leuporeau MT, Fraile L, Montoya M, Cordoba L, Domingo M, Ehrensperger F, Summerfield A, Ganges L. Postnatal persistent infection of classical swine fever virus and its immunological implications. *PLoS One*. 2015;10:e0125692
11. Brock KV, Chase CC. Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet Microbiol* 2000; 77:209-214.
12. Kirkland PD, McGowan MR, Mackintosh SG. Factors influencing the development of persistent infection of cattle with pestiviruses. In *Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*. Lyon, France: European Society for Veterinary Virology. 1993; 117-121.

13. Bachofen C, Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Stalder H, Peterhans E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet Microbiol*, Amsterdam. 2010; 141:258-267.
14. Salgado R, Hidalgo-Hermoso E, Pizarro-Lucero J. Detection of persistent pestivirus infection in pudú (*Pudu puda*) in a captive population of artiodactyls in Chile. *BMC Vet Res*. 2018; 14:37.
15. Stewart WC, Miller LD, Kresse JI, Snyder ML. Bovine viral diarrhea infection in pregnant swine. *Am J Vet Res*. 1980; 41:459-462.
16. Walz PH, Baker JC, Mullaney TP, Maes RK. Experimental inoculation of pregnant swine with type 1 bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004; 51:191-193.
17. Almeida HMS, Gatto IRH, Santos ACR, Pereira DA, Nascimento KA, Baraldi TG, Mechler ML, Oliveira LG. Bovine viral diarrhea virus infections in pigs: why is this situation important for Brazilian herds?. *Arq Inst Biol*. 2017; 84.
18. Arias M, Romero L, Gómez-Villamandos JC, Sánchez-Vizcaíno JM. Peste Porcina Clásica (PPC). In: SÁNCHEZ-VIZCAÍNO JM. (Ed. y Coord.). Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. Madrid, 2003. Disponível em: <<http://sanidadanimal.info/cursos/curso/>>. Acesso em: 23. Mar. 2017.
19. Vogel FSF, Scherer CFC, Flores EF, Weiblen R, de Lima M, & Kunrath CF. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). *Cienc Rur*. 2001; 31:831-838
20. Flores EF, Weiblen R, Vogel FSF, Roehe PM, Alfieri AA, & Pituco EM. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pes Vet Bras*. Rio de Janeiro, RJ. 2005; 25:125-134.
21. Ridpath JF, Bauemann FV, Flores EF. Flaviviridae, In: Flores, E.F. (Ed.) *Virologia Veterinária*. 2nd Ed. Santa Maria: Editora UFSM. 2012; 565-589.
22. 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*). *J Vet Diagn Invest*. 2010; 2:360-365.
23. Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of BVDV in pooled bovine serum. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:343-346.
24. World Organisation For Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals birds and bees. [7 th. Paris, 2012. v. 2], chap. 2.4.8, p. 698-711. [Versão adotada em 2008]. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf> Acesso em: 22 out. 2017

25. Terpstra C, Wensvoort G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res Vet Sc.* 1988; 45:137-42
26. Vannier P, Leforban Y, Camero R, Cariolet R. Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine pestivirus pathogen for the pig. *Ann Rech Vet.* 1988; 19:283-90.
27. Wensvoort G, Terpstra C. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res Vet Sc.* 1988; 45:143-8.
28. Paton DJ, Simpson V, Done SH. Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet Rec.* 1992; 131:185-8.
29. Wieringa-Jelsma T, Quak S, Loeffen WLA. Limited BVDV transmission and full protection against CSFV transmission in pigs experimentally infected with BVDV type 1b. *Vet Microbiol.* 2006; 118:26-36.
30. Santos ACR, Nascimento KA, Mechler ML, Almeida HMS, Gatto, Carnielli LGF, Pollo AS, Oliveira LG, Experimental Infection and Evaluation of Airborne Transmission And Nose-To-Nose Contact of Bovine Viral Diarrhea Virus Among Weaned Piglets. *Australian Journal of Basic and Applied Science.* 2017; 12-19.
31. Castrucci G, Titoli F, Ranucci S, Castro Portugal FL, Cilli V, Pi B. Study of the experimental infection of pigs with bovine viral diarrhea (BVD) virus. *Bolletino dell'Istituto Sieroterapico Milanense, Milan.* 1974; 53:585-591.
32. 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 Vétérinaires, London.* 1992; 23:73-82.
33. Walz PH, Baker JC, Mullaney TP, Kaneene JB, Maes RK. Comparison of type I and type II bovine viral diarrhea virus infection in swine. *Can J Vet Res-Revue Canad Rec Vet.* 1999; 63:119-123.
34. Paton DJ, Done SH. Congenital infection of pigs with ruminant-type Pestiviruses. *J Comp Pathol, London.* 1994; 111:151-163.
35. Pereira DA, Peron JB, Baraldi TG, Almeida HMS, Storino GY, Gatto IRH, Jorge RN, Mathias LA, Oliveira LG. Evaluation of leucogram in pregnant sows infected with BVDV-2. In: XVIII Congresso Abraves, 18, 2017, Goiânia. *Anais do XVIII Congresso da Abraves.* 2017; 91-92.

36. Pensaert MB, Sanchez RE, Jr, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol.* 2004; 175-183
37. Krametter-Froetscher R, Benetka V, Duenser M, Bago Z, Theiner A, Preyler B, Moestl K, Vilcek S, Baumgartner W: Descriptive study of a pestivirus infection in an Austrian goat. *Vet Rec.* 2008; 163:192-194
38. Bachofen C, Vogt HR, Stalder H, Mathys T, Zanoni R, Hilbe M, Schweizer M, Peterhans E: Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet Res.* 2013; 44:32.
39. Kulcsar GP, Soós L, Kucksera L, Glavits, V. Palfi. Pathogenicity of a bovine viral diarrhea virus strain in pregnant sows: Short Communication. *Acta Vet Hung.* 2001; 49:117-120.
40. Bourne FJ. Nutrition of the young farm animals. The immunoglobulin system of the suckling pig. *Proc Nut Soc.* 1973; 32:205-215.
41. Machado Neto R, Graves CN, Curtis SE. Immunoglobulins in piglets from sows heat-stressed prepartum. *J An Sci.* 1987; 65:445-455.

Apêndices

APÊNDICE A – Exames para detecção do vírus da diarreia viral bovina e anticorpos contra o BVDV, por RT-PCR e virusneutralização, respectivamente, em amostras de sangue e soro de um bezerro inoculado com o agente pela via oronasal.

Tipo de amostras/Nºtotal: 19 soros e 19 sangues Espécie: BOVINO Sexo: M			
DATA COLHEITA	BVD		
	BVDV I – VN (soro)	BVDV II – VN (soro)	RT-PCR (sangue)
D(0)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(1)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(2)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(3)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(4)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(5)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	POSITIVO
D(6)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	POSITIVO
D(7)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	POSITIVO
D(8)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	POSITIVO
D(9)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	POSITIVO
D(10)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	POSITIVO
D(11)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	POSITIVO
D(12)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	POSITIVO
D(13)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	POSITIVO
D(14)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	POSITIVO
D(15)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	POSITIVO
D(16)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO
D(17)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO
D(18)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO
D(19)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO
D=Dias pós inoculação.			