

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DOENÇA DAS MUCOSAS ASSOCIADA À DERMATITE
GENERALIZADA EM BOVINOS EM MATO GROSSO DO
SUL**

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL- BRASIL
DEZEMBRO DE 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DOENÇA DAS MUCOSAS ASSOCIADA À DERMATITE
GENERALIZADA EM BOVINOS EM MATO GROSSO DO
SUL**

Luiz Carlos Louzada Ferreira
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Amaral de Lemos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL- BRASIL
DEZEMBRO DE 2007

À minha esposa Nícia Maria Machado Ferreira, aos meus filhos Mariana Machado Ferreira e Felipe Machado Ferreira, que entenderam as minhas ausências e deram força para realização deste sonho.

Ao amigo Ricardo Antônio Amaral de Lemos, pela dedicação e compreensão durante esta caminhada.

AGRADECIMENTO

A DEUS, por esta oportunidade de enriquecimento profissional, à minha esposa Nícia e meus filhos Mariana e Felipe, que são a essência de minha vida, que entenderam e deram força nas minhas ausências.

Aos colegas de curso pelo estímulo e companheirismo.

Este trabalho contou com a colaboração de muitas pessoas, e seria difícil enumerá-las uma a uma. Sem o trabalho dos professores Cássia Leal (FAMEZ/UFMS), Dr. David Drimeier (DP/UFRGS), Dr. Eduardo Furtado Flores (SV/UFSM) e seus auxiliares, esta dissertação não chegaria ao fim. Importante também foi a colaboração do Sr. Plínio Rocha e do médico-veterinário Orivaldo Melo, que confiaram em nosso trabalho e abriram as portas da Fazenda Nazareth.

Em especial, ao Professor Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos, pelo exemplo de dedicação ao trabalho, amizade e incentivo.

À equipe da Equali, pelo apoio incondicional para alcançarmos nosso objetivo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 EPIDEMIOLOGIA	7
2.1 Prevalência da infecção	7
2.2 Transmissão do vírus	10
2.3 Transmissão dentro dos rebanhos	12
2.4 Transmissão entre rebanhos.....	14
3 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA	15
3.1 Infecção subclínica por BVDV	16
3.2 Infecção aguda por BVDV	16
3.3 Infecção aguda severa por BVDV	17
3.4 Síndrome Hemorrágica	18
3.5 Imunossupressão.....	20
3.6 Efeito da infecção aguda pelo BVDV sobre o sistema reprodutivo	20
3.7 Abortos	22
3.8 Defeitos congênitos	22
3.9 Infecção pelo BVDV durante o estágio final da gestação.....	23
3.10 Infecção persistente	23
3.11 Enfermidades que ocorrem em animais persistentemente infectados.....	24
3.11.1 Doença das mucosas.....	24
3.11.2 Doença das Mucosas Aguda	26
3.11.3 Doença das mucosas crônica	27
3.11.4 Doença das mucosas seguida por recuperação.....	28
3.11.5 Dermatite	28
4 ACHADOS DE NECROPSIA.....	29
4.1 Doença das mucosas	29
4.2 Infecção aguda pelo BVDV.....	29
4.3 Abortos e defeitos congênitos	30
5 DIAGNÓSTICO.....	30
5.1 Isolamento viral.....	30
5.2 Detecção do antígeno e anticorpo viral	31
6 TRATAMENTO, PROFILAXIA E CONTROLE.....	33
7 SITUAÇÃO DA INFECÇÃO PELO BVDV NO BRASIL	39
8 OBJETIVO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ARTIGO	60
<i>Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos em Mato Grosso do Sul.....</i>	<i>61</i>
INTRODUÇÃO	63
MATERIAL E MÉTODOS	65
RESULTADOS	67
DISCUSSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina, sigla em inglês BVDV, é envelopado, pequeno, da família Flaviridae, gênero *Pestivirus*, ao qual, também, pertence o vírus da peste suína clássica e da doença das fronteiras (em inglês Border Disease Vírus, sigla BDV) dos ovinos (Francki et al. 1991, Radostits et al. 2002, Potgieter 2004). Amplamente distribuído entre a população bovina mundial, sua prevalência pode atingir 70% a 80% dos bovinos e até 80% dos rebanhos na América do Norte e em alguns países europeus. No Brasil, levantamentos sorológicos, quadros clínico-patológicos e o isolamento do agente têm sido realizados nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul (Flores et al. 2005).

O BVDV apresenta dois biótipos reconhecidos com base no efeito causado por sua replicância em cultivos celulares, o biótipo citopático (CP) e o biótipo não-citopático (NCP) do vírus (Steven & Grooms 2004). A maioria dos isolados de campo pertence ao biótipo NCP e está associado com diversas manifestações clínicas da infecção (Grooms 2004), enquanto que o vírus do biótipo CP é quase que exclusivamente isolado de casos da doença das mucosas, o que indica que esses últimos se originam de biótipos NCP por meio de mutações ou recombinações no genoma (Meyers et al. 1992, 1996).

São descritos dois genótipos, BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 (Ridpath et al. 1994, Pellerin et al. 1994, Wolfmeyer et al. 1997), conforme propriedades antigênicas e análise filogenética (Ridpath et al. 1994). Os isolados de BVDV tipo 1 (BVDV-1) são considerados as amostras clássicas do vírus, e são, freqüentemente, utilizados para produção de vacinas e nos laboratórios de diagnóstico e pesquisas. O BVDV tipo 2 (BVDV-2) foi identificado inicialmente no final dos anos de 1980 em surtos severos da enfermidade na América do Norte (Corapi et al. 1989, Carman et al. 1998). Posteriormente, o BVDV tipo 1 foi classificado em dois subgenótipos: BVDV-1a e BVDV-1b (Pellerin et al. 1994). A origem e evolução do BVDV-2 ainda são discutidas (Flores et al. 2002). Atualmente, sabe-se que o BVDV-2 nem sempre está associado à enfermidade severa e tem sido isolado de outras fontes (Ridpath et al. 1994, Wolfmeyer et al. 1997, Bolin & Ridpath 1996). Estudos recentes de análise filogenética com amostras do BVDV-2 isolados no Brasil forneceram evidências para apoiar a existência de subgenótipos dentro do BVDV-2, de modo que este pode ser subdividido em subgenótipos 2a (BVDV-2a) e 2b (BVDV-2b) (Flores et al. 2002). Segundo esses

autores, a existência de subgrupos dentro do genótipo BVDV-2, os quais apresentam heterogeneidade genética semelhante à observada nos subgrupos do BVDV-1, é uma evidência contrária de que os isolados do BVDV-2 tenham se originado de uma evolução recente do BVDV-1.

Essas evidências têm importantes implicações sobre a origem e emergência do genótipo BVDV-2, e constituem argumentos contrários à hipótese de emergência recente do genótipo BVDV-2. De acordo com esses dados, o BVDV-2 existiria em tempo suficiente para se dividir em dois subgrupos distintos e estabelecer variantes geográficas. Não há, porém, evidências para sugerir que as cepas do BVDV-2 existam na natureza há tanto tempo quanto os isolados do BVDV-1. Desse modo, BVDV-2, provavelmente, consiste de um grupo de vírus isolado recentemente e não de um novo grupo de vírus (Flores et al. 2002).

O conhecimento da diversidade antigênica do BVDV é importante para o conhecimento de grande variedade de patogenia das enfermidades causadas pelo vírus, para o monitoramento da epidemiologia dos diferentes tipos e o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico laboratorial e vacinas (Hamers et al. 2002).

2 EPIDEMIOLOGIA

2.1 Prevalência da infecção

A prevalência da infecção por BVDV tem sido investigada em diversos estudos seccionais (Houe 1995). Diferentes observações demonstraram variações consideráveis tanto na prevalência de animais persistentemente infectados quanto na prevalência de reações sorológicas positivas para anticorpos contra BVDV. Várias diferenças na estrutura da população bovina e de sistemas de criação e manejo podem influenciar na variação da prevalência da infecção (Houe 1999). Regiões com elevadas densidades populacionais e grandes rebanhos possuem maior prevalência de infecção quando comparadas a regiões com baixas densidades populacionais e rebanhos menores (Alenius et al. 1986, Houe & Meyline 1991, Loken et al 1991a). Correlação positiva entre a soroprevalência e a densidade populacional foi observada na Espanha, tanto entre animais de um mesmo rebanho leiteiro como em diferentes propriedades (Vega et al. 1997). No Canadá, o maior número de amostras encaminhadas para o diagnóstico laboratorial de infecção por BVDV correspondeu às regiões geográficas com maior densidade populacional de bovinos (Alves et al. 1996a). Em sistemas de criação

fechados, como confinamentos, um único bovino persistentemente infectado (PI) pode infectar mais de 90% dos outros bovinos antes que eles completem 3-4 meses de idade (Houe et al.1993). A transmissão lenta em um rebanho é observada quando os bovinos são separados em pastos diferentes (Houe et al. 1995, Taylor et al.1997).

A maioria dos estudos de prevalência em rebanhos leiteiros apresenta resultados similares, ou seja, 0,5% a 2% de bovinos PI e 60% a 85% de bovinos sorologicamente positivos (Harkness et al. 1978, Edwards et al. 1987, Reinhardt et al. 1990, Houe & Meyling 1991, Frey et al. 1996, Braun et al. 1997, Vega et al. 1997). Poucos estudos de prevalência têm sido realizados em rebanhos bovinos de corte. No Canadá, a prevalência de animais PI, em uma amostra de 5.129 bezerros, foi inferior a 0,1% (Taylor et al. 1995). Nos Estados Unidos, um levantamento em 1.755 bovinos de 119 propriedades de confinamento de bezerros revelou a prevalência de anticorpos em 57% dos bezerros (Paisley et al. 1996). Na Nova Zelândia, a prevalência em 140 bovinos de corte examinados foi de 63% (Peréz et al. 1994).

A presença de infecção persistente foi estudada por meio do isolamento viral em 128 rebanhos bovinos de corte dos Estados Unidos da América (Wittum et al. 2001). Foram testados 18.931 bezerros com idade até quatro meses, provenientes de 76 rebanhos selecionados ao acaso e 52 de rebanhos com suspeita clínica da infecção. Um total de 56 bezerros, de treze rebanhos diferentes, foi identificado positivo no teste inicial. Dez rebanhos (19%) dos que apresentaram suspeita clínica da infecção por BVDV e três rebanhos (4%) dos selecionados ao acaso possuíam um ou mais bezerros positivos para BVDV. Informações posteriores obtidas de 54 desses 56 bezerros revelaram que 10 deles (18%) morreram antes do desmame e um (2%) foi eliminado por ter tido crescimento reduzido. Trinta e três dos 54 bezerros (61%) inicialmente positivos permaneceram positivos para BVDV até os seis meses de idade, confirmando a condição de persistentemente infectados. As mães de 45 dos 56 bezerros positivos foram testadas e três delas (7%) foram identificadas como PI, indicando que muitos bezerros PI são produtos de infecção aguda da vaca durante a gestação.

A proporção de vacas prenhes identificadas, durante o diagnóstico de gestação no outono do ano anterior, foi significativamente ($P < 0,05$) menor (5%) nos rebanhos que apresentaram o nascimento de bezerros PI durante a estação de parição do ano seguinte, quando comparada aos rebanhos selecionados ao acaso que não apresentaram bezerros PI. Muitos dos animais identificados como PI sobreviveram ao desmame e

podem ser uma importante fonte de infecção para o rebanho por toda a estação de monta e nos estádios iniciais da gestação.

Nos sistemas produtivos de bovinos da Dinamarca, a incidência anual do risco de infecção de um bovino tem sido estimada em 34% (Houe & Meyling 1991). Em um modelo de disseminação da enfermidade, calcula-se que a infecção cause o nível máximo de perdas econômicas com a incidência de risco de 45% (Houe et al. 1995), a qual corresponde à prevalência máxima de animais PI de 3,4%. Entretanto, considerando-se a elevada mortalidade de animais PI (Houe et al. 1993), a prevalência de animais PI em uma população infectada pelo BVDV, mesmo em seu nível máximo, é menor que 2%. Desse modo, o que se observa com vários estudos é que o BVDV, em várias regiões, tem se disseminado na população bovina próximo ao nível máximo. Ainda assim, em algumas regiões a prevalência de infecção é muito menor por causa das circunstâncias mencionadas (Houe 1999).

A prevalência de rebanhos com infecções correntes ou recentes têm demonstrado considerável variação. A pesquisa de anticorpos para o BVDV tanto em animais individualmente, quanto no tanque de leite, demonstra que a prevalência de rebanhos infectados, geralmente, está entre 70% e 100% (Edwards et al. 1987, Reinhardt et al. 1990, Houe & Meyling 1991, Niskanen et al. 1991, Niskanen 1993, Braun et al. 1997, Vega et al. 1997). Entretanto, a prevalência do rebanho leiteiro infectado foi de 37% na Noruega (Waage et al. 1997) e menor que 1%, na Finlândia (Laamanen & Veijalainen 1997). Nos dois países, os estudos foram feitos pela pesquisa de anticorpos em tanque de leite.

Poucos estudos têm sido realizados visando a estabelecer a prevalência de animais PI. Esses animais foram encontrados em 10 de 19 rebanhos (53%) na Dinamarca, 3 de 20 rebanhos (15%) nos Estados Unidos, e em 149 de 329 rebanhos (45%) na Alemanha (Houe & Meyling 1991, Houe et al. 1995, Frey et al. 1996). Estudos baseados em testes realizados no tanque de leite, em 16.113 rebanhos leiteiros, estimaram que 39% delas possuíam animais PI na Dinamarca (Bitsch & Ronsholt 1995).

Um estudo em rebanhos na Dinamarca revelou que em 8 de 9 rebanhos estudados, ocorreram novas infecções, o que correspondeu a um risco anual de incidência de novas infecções de 52% (Houe & Palfi 1993). Na Suíça, exames repetidos em tanque de leite revelaram um aumento significativo nos títulos de anticorpos, em 5 de 43 rebanhos com um título inicial baixo, e 7 de 91 rebanhos em outro estudo,

correspondendo a uma incidência anual de 12% a 18%, respectivamente (Niskanen et al. 1995).

Análises baseadas na identificação de rebanhos positivos no Canadá, após a ocorrência dos surtos causados por cepas altamente virulentas de BVDV tipo 2, demonstraram que a infecção, possivelmente, ocorreu de forma epidêmica e não endêmica. O número de animais positivos encaminhados para os laboratórios de diagnóstico em Ontário aumentou significativamente, passando de 10 casos positivos para cada 500 amostras de rebanhos em 1992, para 50 casos positivos em cada 500 amostras de rebanhos encaminhados (Alves et al. 1996b). A distribuição de cepas altamente virulentas comparadas às cepas de baixa virulência necessita de mais estudos epidemiológicos, pois apresenta conseqüências importantes para a transmissão da enfermidade e, conseqüentemente, do impacto econômico desta.

2.2 Transmissão do vírus

Os bovinos PI são a principal fonte de transmissão liberando continuamente grandes quantidades do vírus para o ambiente (Coria & McClurkin 1978, Brock et al. 1991). Pequenas quantidades do vírus podem ser excretadas por bovinos com infecção aguda durante poucos dias (Brownlie et al. 1987). A transmissão tem sido demonstrada de pequenos ruminantes para os bovinos e vice-versa (Carlsson 1991, Loken et al. 1991b, Carlsson & Belak 1994, Paton et al. 1995), e BVDV tem sido isolado de muitos outros ruminantes selvagens criados em cativeiros ou de vida livre, os quais são considerados fontes potenciais do vírus. A detecção de uma prevalência maior de animais reagentes positivos para a presença de anticorpos contra o BVDV em renas do que em bovinos e ovinos foi observada no Norte da Noruega, sugerindo àquela espécie animal como um reservatório entre os ruminantes de vida livre (Loken 1995). BVDV também tem sido isolado de suínos (Terpstra & Wensvoort 1988), mas sua importância na transmissão do vírus é desconhecida. Embora a prevalência da infecção tenha sido relatada entre suínos que estavam em contato com bovinos (Loken 1995), a ocorrência da infecção pelo BVDV em suínos, sem evidências de que os bovinos fossem a fonte de infecção, também é descrita (Frey et al. 1995).

Existem vários caminhos pelos quais o BVDV pode ser transmitido dos animais infectados para os animais suscetíveis. O contato direto com um bovino PI é o meio mais eficiente de transmissão do vírus em condições naturais (Cook et al. 1990, Niskanen et al. 1996). Uma hora de contato direto narina a narina foi suficiente para a

ocorrência da transmissão (Travén et al. 1991). O contato direto com animais com infecção aguda também pode transmitir o vírus, embora de maneira menos eficiente (Meyling et al. 1990). Como exemplo, cita-se que a infecção aguda de 12 novilhas, por meio da inseminação artificial com sêmen de um touro PI, não disseminou a infecção para quatro animais suscetíveis mantidos em contato próximo (Meyling & Jensen 1988). Para efeito comparativo, apenas três dentre 60 novilhas soronegativas soroconverteram após serem inseminadas com sêmen de um touro com infecção aguda (Kirkland et al. 1997). Em outro estudo, nenhum de 14 bezerros soroconverteu após dois dias em contato próximo com outros bezerros com infecção aguda, incluindo o contato narina a narina (Niskanen et al. 1996).

O BVDV é excretado tanto no sêmen de touros PI como em touros com infecção aguda (Paton et al. 1989, Kirkland et al. 1991).

O vírus pode continuar sendo liberado no sêmen após o final da viremia (Kirkland et al. 1991), sendo a liberação persistente do BVDV no sêmen observada em um touro na ausência de viremia (Voges et al. 1997). Portanto, a realização dos testes regulares dos touros de centrais de inseminação artificial, visando a identificar a presença do vírus no sêmen (por meio do isolamento viral) e a soroconversão nos touros, é essencial (Houe 1999). O BVDV também foi recuperado no sêmen obtido após a inoculação de touros soronegativos, demonstrando que o vírus pode persistir por vários meses após a infecção, no sêmen de touros com infecção aguda (Givens et al. 2003).

A transmissão via transferência de embriões é possível, mas pode ser evitada com a utilização dos procedimentos de lavagens recomendados, sempre que os embriões são transferidos de doadoras PI (Wentik et al. 1991a, Bak et al. 1992, Brock et al. 1997). Entretanto, os procedimentos de lavagem recomendados foram ineficientes para remover o vírus de um sistema de fertilização *in vitro* (Bielanski & Jordan 1996). Deve-se ter especial atenção com o soro fetal utilizado para a transferência de embriões, o qual pode estar contaminado com o BVDV (Houe 1999).

O nascimento de um bezerro saudável, negativo tanto para o isolamento quanto para a presença de anticorpos contra o BVDV, filho de uma novilha doadora de embriões, persistentemente infectada, foi obtido por transferência de embriões (Smith & Grimmer 2000). Por outro lado, uma menor resposta à superovulação foi observada nessa fêmea, o que está de acordo com outros trabalhos anteriormente realizados (Brock et al. 1997, Kafî et al. 1997). Também foi observado um número significativamente

maior de corpos lúteos e de óvulos recuperados de fêmeas-controle comparado com fêmeas infectadas (Kafi et al. 1997).

Várias rotas de transmissão indiretas ou por meio de vetores têm sido demonstradas, como exemplo, utilização de “formigas” para contenção de animais e reutilização de agulhas (Gunn 1993), luvas de palpação retal (Lang-Ree et al. 1994) ou pelo uso de vacinas vivas ou contaminadas (Loken et al. 1991b). A transmissão também pode ocorrer por meio de insetos hematófagos (Tarry et al. 1991). Deve-se considerar que muitos estudos de transmissão experimental utilizam um período de contato inferior ao que ocorre entre dois rebanhos vizinhos, de modo que sua importância prática não está clara (Houe 1999). De maneira geral, os pestivírus são relativamente pouco resistentes e facilmente inativados no ambiente, e sua infectividade fora do hospedeiro é de curta duração (Duffel & Hakness 1985).

Não está comprovado que ocorra a transmissão pelo vento, existindo controvérsias a esse respeito. No entanto, a transmissão pelo ar é considerada possível à distância de vários metros por alguns autores (Bitsch & Ronsholt 1995).

A dose infectante do vírus é altamente dependente da rota de transmissão. Um estudo demonstrou que altas diluições do soro de um animal PI, que apresentava o título de $10^{4.3}$ TCID, antes da diluição, induziram a soroconversão em novilhas nas seguintes condições: 1) 0,5 ml com soro não diluído pela via conjuntival; 2) 2 ml diluídos na 10^{-1} inoculados pela via intranasal; e 3) 2 ml diluídos na 10^{-5} inoculados pela via subcutânea (Cook et al 1990).

2.3 Transmissão dentro dos rebanhos

A taxa de transmissão dentro de um rebanho depende se o vírus é introduzido por um animal PI, ou por outros meios que iniciaram uma infecção aguda sem a presença inicial do animal PI (Houe 1999). A descoberta de animais PI geralmente ocorre em dois grupos de idade distintas, o que, provavelmente, indica a ocorrência de dois episódios de infecção aguda entre as vacas. Isso significa que, em geral, a infecção é introduzida no rebanho por outros meios, e não por animais PI. Após a infecção aguda inicial, que é de curta duração (poucas semanas), apenas uma pequena proporção de animais é infectada antes que a transmissão do vírus cesse (Houe 1992).

Em condições experimentais, têm sido demonstrados diferentes resultados referentes à infecção aguda. Em dois desses estudos, o vírus circulou por 2 a 2,5 anos, apesar da ausência de animais PI no rebanho e do contato direto com animais PI

(Barber & Nettleton 1993; Moerman et al. 1993). Entretanto, a natureza exata da lenta disseminação do vírus não foi esclarecida. Desse modo, é possível que a aparente circulação lenta do vírus resultou da introdução múltipla de novos vírus em diferentes tempos, em vez da transmissão única e progressiva a partir de animais com infecção aguda (Barber & Nettleton 1993).

A virulência do vírus pode influenciar a taxa de transmissão e estender o período de transmissão. Vem sendo relatada a ocorrência de vários casos de BVDV aguda com manifestações graves dentro de poucas semanas (David et al 1994). Em outro estudo de surtos de BVDV em dez rebanhos, o vírus se disseminou para numerosos animais, mas a disseminação foi mais lenta e progressiva e a média de duração dos surtos foi de 13 semanas com um intervalo de 4 a 32 semanas (Tremblay et al. 1996). A disseminação mais eficiente do vírus, observada na infecção aguda por cepas virulentas do BVDV, pode não ser apenas uma característica do vírus em si, mas também um efeito de gravidade das manifestações clínicas, como a ocorrência de tosse, que aumenta a quantidade de vírus excretado (Houe 1999).

Quando nascem animais PI, a transmissão secundária para os demais animais suscetíveis ocorre rapidamente (Houe 1992). A presença de animais PI em um rebanho foi responsável pela infecção de 90% dos bovinos com idade inferior a 3-4 meses de idade (Houe et al. 1993). Dados semelhantes foram encontrados por outros autores (Moerman et al. 1993) que observaram a soroconversão, dentro de três meses, em todos os bovinos suscetíveis que foram colocados em contato com animais PI. Em outro estudo, animais soronegativos soroconverteram dentro de cinco meses, após a introdução de um animal PI. Quando o contato ocorreu à curta distância, os animais soroconverteram dentro de dois meses, enquanto que com distâncias maiores o tempo de soroconversão não foi bem definido (Wentink et al. 1991b). Em rebanhos estabulados ou que pastejam em locais separados, a transmissão a partir de animais PI pode não ocorrer até que estes entrem em contato próximo com os animais suscetíveis (Houe et al. 1995, Taylor et al 1997).

Não está claro se a disseminação do vírus por bovinos PI ocorre primariamente a partir do próprio PI, ou se a disseminação principal é a secundária por intermédio dos bovinos com infecção aguda. Mas considerando-se que a disseminação a partir dos animais com infecção aguda é limitada, a mais provável é que o vírus seja transmitido pelos animais PI. Nesse caso, a transmissão, possivelmente, seria pelo ar, mas é improvável que um único animal PI possa ter contato com todos os animais suscetíveis.

Embora possa haver a transmissão por alimentos, bebedouros ou instrumentos de tatuagem (Houe 1999).

Existem algumas discrepâncias sobre a taxa com que a infecção aguda se dissemina em um rebanho, porém, geralmente, ela tem pouca importância prática. Na maioria dos casos, uma vaca no estágio inicial de gestação poderá tornar-se infectada e gerar um animal PI que reforçará a transmissão com a eventual infecção de todo o rebanho (Houe 1999).

2.4 Transmissão entre rebanhos

O BVDV é introduzido em rebanhos suscetíveis principalmente por meio da compra de animais PI, ou vacas prenhes de fetos PI. Assim, se a prevalência de animais PI é de 2% (incluindo vacas prenhes de fetos PI), o risco (P) da introdução de animais PI, dentro de uma aquisição a partir de compras feitas ao acaso sem o teste dos animais, é $\{1 - (\text{a probabilidade da compra de um animal não PI})^n\}$, onde (n) é o número de animais comprados, ou seja, $P = 1 - 0,98^n$. Assim, a compra de 20 animais envolve um risco calculado de $1 - 0,98^{20} = 33\%$. Entretanto, tem-se demonstrado que a infecção é introduzida com muito maior frequência do que poderia ser explicada pelo risco de aquisição de animais PI, pois novas infecções foram observadas em rebanhos que não realizaram compras recentes de animais PI (Houe & Palfi 1993).

Assumindo-se um risco anual de infecção de 30%, em uma população onde 50% dos animais são sorologicamente positivos, e, novamente, assumindo-se que um animal com infecção aguda dissemina o vírus por dez dias (2,7% dos dias do ano), então a taxa de risco da compra de um animal com infecção aguda será na média: $0,3 \times 0,5 \times 0,0027 = 0,4\%$. Como o risco da introdução de um animal PI (conforme cálculo no parágrafo anterior), o risco de introdução de um animal com infecção aguda a partir da compra de um lote de 20 animais será de: $1 - 0,996^{20} = 8\%$. Entretanto, como comentado, alguns dos animais com infecção aguda são capazes de transmitir o vírus. Embora essas contas sejam apenas cálculos aproximados, a compra de animais sem qualquer teste ou quarentena demonstrou tanto na teoria quanto na prática que esse é um importante meio de introdução da infecção (Houe 1999).

O contato com bovinos de outros rebanhos, como animais pastejando em locais próximos, bem como a mistura de animais por ruptura de cercas, exposições e outras, também pode ser importante para a transmissão do BVDV (Houe 1999). Em levantamentos sorológicos pareados em 41 rebanhos leiteiros da Dinamarca, avaliando

possíveis fatores de risco para novas infecções, constatou-se que a compra de animais representou uma significativa elevação do número de animais sorologicamente positivos ($P=0,05$). O pastejo de bovinos a pequenas distâncias de outros rebanhos, ou o contato com bovinos de outros rebanhos por outras formas, demonstrou estar moderadamente associado com o número de animais sorologicamente positivos ($P=0,085$) (Houe et al. 1997).

Nos rebanhos com infecção pelo BVDV, quase sempre foi observado algum contato que poderia explicar as novas infecções. Entre 11 rebanhos que passaram de prevalência baixa para altas da infecção, algum tipo de contato com bovinos de outros rebanhos foi documentado em muitos casos. No entanto, em um rebanho não foi observado um possível contato com outros bovinos, mas um cordeiro havia sido introduzido no rebanho dois anos antes, sem ser submetido a testes. Esse animal poderia ser a fonte de infecção. A investigação aprofundada das reinfecções em um número significativo de rebanhos é necessária para classificar a importância do contato com bovinos comparado com outras rotas de infecção, incluindo contato indireto com pessoas e seus equipamentos na transmissão do vírus (Houe et al. 1997, Houe 1999).

Deve-se ter atenção com a utilização comum de pastagens (por exemplo, em arrendamentos) as quais representam riscos para rebanhos que não estavam previamente infectados (Schaller et al. 1996). Entretanto, a importância exata do manejo é difícil de ser determinado por causa do pequeno tamanho das amostras da maioria dos estudos de prevalência (Houe 1999).

A epidemia de BVD aguda, que ocorreu em Ontário, Canadá, no ano de 1993, indica que cepas altamente virulentas podem se disseminar rapidamente entre rebanhos (Alves et al 1996a,b). Entretanto, ainda é preciso esclarecer se as cepas altamente virulentas se disseminam mais rapidamente do que aquelas de baixa virulência, ou se elas parecem se disseminar com maior rapidez por causa da observação mais rápida e fácil dos sinais clínicos. Também deve ser esclarecida a importância de infecções associadas, pois o aumento dos abortos causados por *Neospora* sp. foi observado, nos surtos descritos no Canadá (Alves et al. 1996a,b).

3 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA

Em função das diferentes manifestações clínicas causadas pelo BVDV, as quais estão relacionadas à patogenia da infecção, os quadros clínicos causados serão abordados com as respectivas patogenias.

A infecção pelo BVDV tem uma variedade de manifestações clínicas que vão desde condições subclínicas até a morte do animal. O quadro clínico que ocorre após a infecção é complexo e depende de diversos fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus, tais como: variedades genéticas, virulência e variação antigênica do BVDV. Os fatores ligados a hospedeiro que influenciam o quadro clínico incluem o fato de o hospedeiro ser imunotolerante ou imunocompetente para o BVDV, o estado fisiológico do hospedeiro (gestação), a idade do feto, o estado imune do animal (contato prévio com o BVDV por exposição natural ou vacinação) e o nível de estresse do rebanho no momento da infecção (Grooms et al. 2002).

3.1 Infecção subclínica por BVDV

Muitos animais que se infectam com o BVDV não apresentam sinais clínicos perceptíveis, e a infecção resulta em febre discreta, leucopenia e a produção de anticorpos neutralizantes para o vírus. A ocorrência de infecções subclínicas explica a presença de animais soropositivos para o BVDV encontrada em muitos rebanhos não vacinados. Estima-se que 70% a 90% das infecções pelo BVDV ocorrem sem a manifestação de sinais clínicos (Grooms et al. 2002).

3.2 Infecção aguda por BVDV

A infecção aguda pelo BVDV geralmente é definida como uma enfermidade clínica que ocorre em bovinos imunocompetentes, os quais não são PI. Essa síndrome geralmente afeta animais com idade entre 6 e 24 meses e tradicionalmente tem sido considerada como causa de enfermidade em bovinos soronegativos, ou em animais que adquiriram imunidade por meio do colostro, mas a perderam antes que a imunidade ativa fosse adquirida. O período de incubação da BVDV aguda é de 5 a 7 dias, e os sinais clínicos observados são febre, leucopenia, depressão, anorexia, descarga oculonasal, erosões e ulcerações na mucosa oral, diarreia e diminuição da produção de leite. O aumento da frequência respiratória pode ser observado e às vezes é incorretamente interpretada como pneumonia; a viremia acompanhada por liberação de pequenas quantidades do vírus pode ocorrer por até 15 dias (Grooms et al. 2002).

A infecção neonatal com o BVDV pode provocar enterite ou pneumonia, mas essa forma de enfermidade parece ocorrer principalmente quando há falhas na transferência da imunidade passiva. Acredita-se que a imunidade humoral adquirida passivamente, por bezerros, seja capaz de protegê-los, a menos que existam variações antigênicas suficientes entre a cepa responsável pelo desafio e aquela com a qual a imunidade colostrar foi adquirida. A infecção viral em bezerros jovens que não possuem imunidade passiva adequada pode resultar em enfermidades secundárias por causa dos efeitos imunossupressores do vírus (Grooms et al. 2002).

A infecção aguda pelo BVDV deve ser diferenciada de outras enfermidades que ocorrem no período neonatal, como as infecções por rotavírus, coronavírus, criptosporidiose, colibacilose, salmonelose e eimeriose. Enfermidades responsáveis por pneumonia em bezerros, como vírus sincicial respiratório bovino, salmonelose, pasteurelose, hemofilose e infecções por micoplasma, também devem ser consideradas. Em bovinos adultos, a enfermidade deve ser diferenciada de outras causas de diarreia, como a paratuberculose, os parasitos gastrintestinais, a deficiência de cobre associada ao excesso de molibdênio e a febre catarral maligna. O diagnóstico diferencial com as enfermidades que causam lesões orais inclui a febre aftosa, a febre catarral maligna, a estomatite vesicular, a estomatite papular e a língua azul (Grooms et al. 2002).

A patogênica da BVDV aguda está relacionada ao dano no epitélio dos sistemas gastrintestinal, respiratório e intertegumentar. O antígeno viral tem sido demonstrado no epitélio da língua, esôfago, criptas e vilosidades do intestino, brônquios e camada basal da pele de bovinos, como BVDV em doenças das mucosas (Ohmann 1983). Nos animais infectados, os antígenos virais também podem ser detectados nas células fagocitárias do timo, linfonodos, placas de Peyer, amídalas e baço (Grooms et al. 2002). Como foram demonstrados pela presença do antígeno, os primeiros tecidos a serem infectados são as amídalas e o trato respiratório. Depois o vírus do BVDV dissemina-se para as superfícies epiteliais e tecidos linfóides. As células mononucleares fagocitárias presentes no tecido linfóide retêm o vírus (Ohmann 1983).

3.3 Infecção aguda severa por BVDV

Até o final dos anos de 1980 e início dos anos de 1990, acreditava-se que a infecção pelo BVDV em bovinos adultos e imunocompetentes, na maioria dos casos, não resultava no aparecimento de sinais clínicos ou, quando estes ocorriam, eram discretos.

Entretanto, uma forma atípica de infecção pelo BVDV foi diagnosticada nos Estados Unidos e no Canadá (Pellerin et al. 1994, Carman et al. 1998, Corapi et al. 1990). Nos surtos descritos no Canadá, a letalidade em bezerros recém-nascidos foi, aproximadamente, de 25%. O quadro clínico caracteriza-se por pneumonia, febre e mortes súbitas em todas as faixas etárias. A ocorrência de abortos é comum, e taxa de 10% a 20% de mortalidade pode ser observada (Carman et al. 1998). As lesões macroscópicas têm aparência similar às aquelas observadas na doença das mucosas, da qual é o principal diagnóstico diferencial (Grooms et al. 2002).

Os isolados do vírus obtidos a partir desses surtos apresentavam maior virulência quando comparados aos isolados anteriores. A caracterização molecular desses isolados revelou que estes eram um grupo distinto do BVDV, classificando-os como BVDV tipo 2 (Ridpath et al. 1994, Pellerin et al. 1994).

Um estudo comparativo da virulência de cinco isolados do BVDV-2 foi realizado por inoculação experimental do vírus em bezerros de seis a nove meses de idade. Amostras virais isoladas de casos fatais com evolução superaguda demonstraram os sinais clínicos (febre e diarreia), lesões (necrose do epitélio do trato gastrointestinal), depleção linfóide, deposição do antígeno do BVDV nos tecidos linfáticos mais severos do que as amostras isoladas de fetos abortados originados de vacas prenhes com infecção transitória, aguda e não fatal. Essas vacas apresentaram outras manifestações clínicas de infecção pelo BVDV-2 além do aborto. Os resultados desse estudo evidenciaram que a severidade das infecções experimentalmente induzidas foi correspondente aos sinais clínicos de infecção natural com os respectivos isolados do BVDV-2 (Kelling et al. 2002).

Observações posteriores dos surtos descritos no Canadá evidenciaram que animais que estavam adequadamente vacinados com vacinas contendo o BVDV tipo 1, aparentemente, foram protegidos contra as manifestações clínicas da enfermidade (Carman et al. 1998). Deve-se enfatizar que não é correto assumir que todos os surtos da BVDV aguda ou severa sejam causados pelo BVDV tipo 2. Nem todos os isolados do BVDV tipo 2 causam enfermidades severas e é provável que alguns isolados do tipo 1 sejam capazes de provocar manifestações clínicas severas (Grooms et al. 2002).

3.4 Síndrome Hemorrágica

Outra forma de manifestação aguda da infecção pelo BVDV em bovinos é a síndrome hemorrágica. Essas infecções caracterizam-se por marcada trombocitopenia,

diarréia sanguinolenta, epistaxe, hemorragia nas superfícies das mucosas, hifema, hemorragia em locais de injeção (pela não coagulação do sangue), pirexia, leucopenia e morte (Corapi et al. 1990). Essa forma de enfermidade parece estar associada aos biótipos não-citopáticos do BVDV (Corapi et al. 1990) e apenas o BVDV tipo 2 tem sido relacionado com essa síndrome (Ridpath et al. 1994, Pelerin et al. 1994). A enfermidade foi reproduzida experimentalmente em bezerros e deve ser diferenciada de outras doenças associadas a síndromes hemorrágicas, tais como o desenvolvimento de septicemias causadas por vírus. Além dos patógenos descritos, que possuem efeito sinérgico com o BVDV no complexo da doença respiratória bovina (BRD), a infecção pelo BVDV também tem sido associada a outras doenças que cursam concomitantes a ela, como a salmonelose, colibacilose, rotavirose, coronavirose e estomatite papular (Grooms et al. 1999). A capacidade do BVDV em produzir imunossupressão contribui para o aumento da severidade dos sinais clínicos relacionados a esses patógenos (Grooms et al. 2002).

Clinicamente, a síndrome hemorrágica causada pelo BVDV-2 pode apresentar similaridade com a doença das mucosas (DM). Entretanto, as duas são entidades nosológicas distintas, pois a síndrome hemorrágica (SH) ocorre na infecção aguda com BVDV-2 não-citopático, com ausência de infecção secundária com biótipos citopáticos do BVDV. A infecção aguda com o BVDV-2 que resulta na SH também é diferente da infecção aguda causada somente por biótipos não-citopáticos do BVDV-1 (Stroffegen et al. 2000).

Algumas lesões observadas na síndrome hemorrágica podem lembrar as alterações encontradas na doença das mucosas. Tanto na SH quanto na DM existem necrose nas placas de Peyer e erosões lineares no cólon e no reto (Stroffegen et al. 2000). A SH difere da DM, pois nela ocorre necrose trombocitopática e há lesões e antígeno viral na adrenal e no pâncreas (Lieber-Tenório et al. 1997).

Também são observadas hemorragias no trato digestivo superior tanto na SH quanto no DM, mas na SH essas hemorragias não estão associadas com erosões e ulcerações severas. A razão para isso é que provavelmente os animais acometidos pela SH morram antes que lesões mais severas se desenvolvam (Stroffegen et al. 2000).

A ocorrência de trombocitopenia e hemorragias atribuídas a diferentes isolados do BVDV-2 recuperados de diferentes áreas geográficas (Carman et al. 1998, Corapi et al. 1990, Rebhun et al. 1989, Ridpath et al. 1994) sugere que a síndrome hemorrágica não é limitada a uma única cepa do vírus (Stroffegen et al. 2000). Essa sugestão é

apoiada pelas variações encontradas nas lesões da SH, uma vez que, nos primeiros relatos (Corapi et al. 1989, 1990, Revlun et al. 1989), foram encontradas lesões e hemorragias na boca e palato mole, enquanto que a infecção experimental com outras cepas do BVDV-2 resultou em lesões mais severas nessas áreas.

Alterações na função plaquetária foram observadas em bezerros infectados experimentalmente com BVDV-2, mas não foi observada em bezerros infectados com BVDV-1, de maneira que essa pode ser uma diferença importante na virulência entre a infecção pelo BVDV-1 e pelo BVDV-2 (Walz et al. 2001).

3.5 Imunodepressão

A patogênese da imunodepressão envolve vários aspectos do sistema imune. O BVDV tem os linfócitos e macrófagos como células-alvo, e a infecção aguda pode resultar em leucopenia transitória com depleção linfóide (Bolin et al. 1985b). A diminuição dos linfócitos T CD4+ e CD8+, bem como de linfócitos B e neutrófilos, também tem sido descrita (Ellis et al. 1988). Estudos *in vitro* sugerem diferentes causas para a imunodepressão, as quais incluem a diminuição da resposta dos linfócitos infectados ao estímulo à mitose, diminuição de produção de interferon, interleucine 1 e 2, do fator de necrose tumoral, e a diminuição de resposta quimiotática a monócitos (Grooms et al. 2002). Adicionalmente, a citotoxicidade mediada por neutrófilos, anticorpos dependentes, e por células pode ser impedida pelo BVDV (Brown et al. 1991). Os neutrófilos de bovinos infectados pelo BVDV têm atividade bactericida reduzida (Roth et al. 1981), e a imunodepressão causada pelo vírus pode ser resultado indireto da produção de prostaglandinas pelas células infectadas (Markham et al. 1985).

A infecção experimental de bezerros de dois a três meses de idade, privados do colostro, com BVDV tipo 2 de baixa virulência, demonstrou que o vírus se disseminou pelos tecidos linfóides e células do epitélio intestinal, mas foi rapidamente eliminado. Depleções transitórias dos tecidos linfóides seguidas por recuperação, também, foram observadas (Liebler – Tenório et al. 2003).

3.6 Efeito da infecção aguda pelo BVDV sobre o sistema reprodutivo

Referente a infecções venéreas, o sêmen de touros PI ou durante a infecção aguda com o BVDV contém o vírus e pode atuar como fonte de infecção (Kirkland et al. 1997). Nos touros com infecção aguda, a liberação do vírus pode se estender além do período de

viremia, por causa da replicação local no trato genital. A liberação persistente do vírus no sêmen de um touro, imunocompetente e não persistentemente infectado, foi observada. Esse animal apresentava infecção localizada nos testículos (Smith & Grimmer 2000), e os autores sugerem que a infecção localizada se deve à resposta imune da barreira hematotesticular. A qualidade do sêmen de touros PI e com infecção aguda tem apresentado tanto padrões aceitáveis quanto inaceitáveis (Grooms 2004).

Observações de campo e estudos sobre as conseqüências da infecção pelo BVDV na reprodução, abordando fêmeas em programas de inseminação artificial, têm apresentado resultados ambíguos (Baker 1995). De maneira geral, esses estudos consideram que o BVDV, em determinadas condições, pode afetar a fertilidade resultando em diminuição das taxas de concepção. O efeito adverso é atribuído a falhas na fertilização, mas a causa exata da infertilidade após a infecção aguda com o BVDV é desconhecida (Grooms et al. 2002). O BVDV tem sido isolado do ovário de vacas e associado à ooforite. Experimentalmente, antígenos do BVDV foram detectados nos ovários de fêmeas submetidas à infecção agudas as quais desenvolveram ooforite 60 dias após (Grooms et al. 1988).

O BVDV afeta a função ovariana em vacas. Estudos evidenciam que as células foliculares e os oócitos permitem a passagem do BVDV em todos os estádios do desenvolvimento folicular, e que uma falha transitória na secreção do estradiol pode acompanhar a infecção aguda (Fray et al. 2000). Esses autores concluem que existem duas rotas potenciais por meio das quais o BVDV pode reduzir a fertilidade na vaca: a diminuição da qualidade do oócito e a interrupção da esteroidogênese gonadal.

A detecção do antígeno viral na placenta e no feto de bovinos com infecção aguda pelo BVDV, utilizando a técnica de imunistoquímica (IHQ) para detecção do antígeno viral, revelou que a infecção fetal pode ocorrer sem a ocorrência prévia ou simultânea de altas concentrações do BVDV no útero ou na placenta de fêmeas com infecção aguda (Fredriksen et al. 1999). O primeiro estágio no qual o antígeno do BVDV pode ser detectado no feto foi de 14 dias pós-infecção, nas células de origem mesenquimal dos pulmões e células grandes do fígado semelhantes a megacariócitos imaturos. Nas membranas fetais intercotiledonárias e nos placentomas, o antígeno do BVDV não foi detectado até 18 e 22 dias pós-infecção, respectivamente, e também não foram encontrados nos tecidos das mães. A distribuição do antígeno viral, também, foi avaliada por meio de IHQ no útero, na placenta e nos fetos de vacas persistentemente infectadas com o BVDV (Fredriksen et al. 1999). O antígeno viral foi detectado em

todos os órgãos examinados e estava presente tanto nas células epiteliais quanto nas não epiteliais. Diferentemente de outros relatos anteriores, os autores mencionaram que apenas as células da região fetal dos placentomas apresentaram reatividade para o antígeno viral. Entretanto, no córion das membranas fetais intercotiledonárias, uma grande proporção de células trofoblásticas demonstrou reatividade para o BVDV, principalmente as células trofoblásticas binucleares. No útero, a gestação parece favorecer a replicação viral, pois o exame de tecidos de fêmeas prenhes evidenciou uma coloração muito mais acentuada e uma maior proporção de células positivas para a presença do antígeno viral do que os tecidos de uma fêmea PI não gestante (Fredriksen et al. 1999).

3.7 Abortos

A infecção transplacentária com o BVDV é um evento comum e o vírus é altamente eficiente nesse processo. A capacidade do BVDV em interromper o desenvolvimento embrionário precoce e causar a morte do embrião é bem conhecida (Dubovi 1994). A infecção transplacentária do feto entre 50 e 100 dias de gestação pode resultar em morte fetal (Baker 1995) e a expulsão do feto pode ocorrer dias ou meses após a infecção. Geralmente, as infecções nos estádios finais da gestação não provocam o aborto, mas, em alguns casos, abortos nesses estádios associados com o BVDV têm sido descritos. Salienta-se que a infecção pelo BVDV pode causar aborto durante qualquer estágio da gestação. Embora a incidência de abortos seja geralmente baixa em rebanhos nos quais se observa a presença de resposta imune ao BVDV, ela pode aumentar dramaticamente em rebanhos com ausência de respostas imunes. Surto de infecção aguda e severa associados ao BVDV tipo 2 resultaram em elevada incidência de abortos (Grooms et al. 2002).

3.8 Defeitos congênitos

A infecção do feto entre os 100 e 150 dias de gestação pode resultar em diversas anormalidades congênitas. Esse período do desenvolvimento fetal corresponde à fase final de organogênese do sistema nervoso central e do sistema imune do feto, o que pode resultar na geração de resposta inflamatória à infecção pelo BVDV. Nesse estágio da gestação, a infecção pelo BVDV pode inibir o crescimento, ou a diferenciação celular, ou ainda causar lise direta das células. Os defeitos congênitos mais frequentes

induzidos pela infecção pelo BVDV são a hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, hipomielinogênese, microftalmia, catarata, atrofia ou displasia da retina, hipotricose, bragnatia e outras anormalidades ósseas, retardo no crescimento e hipoplasia pulmonar (Grooms et al. 2002).

3.9 Infecção pelo BVDV durante o estágio final da gestação

Bezerros que sofreram infecção transplacentária com o BVDV no estágio final da gestação podem ser normais ao nascimento, e são soropositivos para BVDV. Para diagnosticar esse tipo de infecção, amostras de soro dos bezerros devem ser colhidas antes que eles mamem o colostro. A infecção pelo BVDV no estágio final de gestação pode resultar no nascimento de bezerros fracos (Grooms et al. 2002).

3.10 Infecção persistente

A infecção do feto com biótipos NCP do BVDV antes do desenvolvimento da imunocompetência fetal pode resultar no nascimento de bezerros que são imunotolerantes e persistentemente infectados com o BVDV. O desenvolvimento da imunotolerância no BVDV é raro após os 100 dias de gestação, mas ocorrências têm sido relatadas até os 125 dias (Grooms et al. 2002). Os bovinos PI são virêmicos, liberam o vírus continuamente e podem parecer saudáveis. Esses animais são imunocompetentes em relação a outros antígenos, inclusive a biótipos heterólogos do BVDV, pois a imunotolerância é específica para biótipos NCP que causam a infecção fetal (Bolin et al. 1985a), logo os animais PI podem ser soropositivos ao BVDV. A prevalência de animais PI em uma população, geralmente, é baixa, e estima-se que o nascimento de um bezerro PI possa ocorrer a cada 100 nascimentos ou 1.000 (Bolin et al. 1985a). As fêmeas PI geram fetos PI, os quais podem resultar na produção de linhagens familiares de animais PI (McClurkin et al. 1973). Provavelmente, os bovinos PI são o principal mecanismo pelo qual o BVDV fica em uma população de bovinos (Grooms et al. 2002).

Os bovinos PI apresentam o risco de desenvolverem a doença das mucosas e parecem constituir uma categoria de risco para o desenvolvimento de outras doenças, logo têm seu tempo de sobrevivência diminuído em relação a animais não PI (Houe 1993). Os animais PI apresentam taxas de mortalidade de 50% nos primeiros 12 meses de vida (Duffel & Harkness 1985) e acredita-se que menos de 10% das fêmeas PI de

reposição em um rebanho possam chegar à lactação. Os bezerros PI podem apresentar tamanho reduzido ao nascimento, desenvolvimento retardado, e alguns deles, com predisposição a infecções, como pneumonia e enterite (Grooms et al. 2002, Werdin et al. 1989), as quais se tornam crônicas e não respondem ao tratamento. Alterações na resposta imune, como supressão na função de linfócitos e de neutrófilos também têm sido descritas em bovinos PI (Roth et al. 1981). Enfermidades subclínicas que eventualmente se tornam clínicas ou imunossupressão seguida por infecções bacterianas secundárias podem explicar o prejuízo no desenvolvimento e a mortalidade elevada nos bovinos PI (Grooms et al. 2002). Alterações pós-morte, como glomerulonefrites e encefalite, têm sido descritas nesses animais (Cutlip et al. 1980).

3.11 Enfermidades que ocorrem em animais persistentemente infectados

3.11.1 Doença das mucosas

A patogenia da doença das mucosas tem sido objeto de revisões de literatura (Bolin 1995). Essa manifestação da infecção pelo BVDV ocorre quando bovinos, que são imunotolerantes e PI com o biótipo não-citopático do BVDV, tornam-se infectados com o biótipo citopático, que possui estreita homologia com o biótipo NCP que causou a infecção persistente. Logo, nem sempre a combinação dos biótipos NCP e CP em um mesmo animal resultará na ocorrência da doença das mucosas. A origem do biótipo CP pode ser externa, como foi observada após a utilização de vacinas vivas modificadas em estudos experimentais, nos quais a doença das mucosas foi reproduzida por superinfecção de animais PI com biótipos CP. Entretanto, o mais provável é que os biótipos CP se originam no próprio animal PI, a partir do biótipo NCP causador de infecção persistente, por meio de um rearranjo molecular.

A hipótese da etiologia da doença das mucosas baseia-se no conjunto das observações obtidas desde 1946, quando a doença foi descrita pela primeira vez, até 1984, quando foi reproduzida experimentalmente (Brownlie et al. 1984). O mecanismo proposto é que a patogenia se inicia quando vacas soronegativas sofrem infecção no estágio inicial da gestação. O vírus é transferido da mãe para o feto. Se este não tiver atingido 120 dias de gestação quando for infectado, portanto, não tendo desenvolvido a imunocompetência, o vírus é “aceito como próprio” pelo feto e persiste por toda a vida do animal. Isso explica a não produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus, levando a sua persistência e evidenciando o estado contínuo da imunotolerância. Em

alguns casos, após o nascimento, geralmente quando o animal está com idade entre 6 e 18 meses, esses animais virêmicos podem sofrer a superinfecção com o biótipo citopático do BVDV, o que resulta no desenvolvimento rápido da doença das mucosas, a qual geralmente é fatal.

Essa hipótese, inicialmente, foi considerada controversa e muito simplista (Harkness et al. 1987), o que levou à realização de novos experimentos para avaliar a relação antigênica entre os dois biótipos causadores da doença das mucosas (Browlie 1990).

Os biótipos NCP e CP, utilizados na reprodução experimental da enfermidade (Browlie et al. 1984), haviam sido isolados de um caso espontâneo da doença das mucosas (denominado COWPE515). Esses dois biótipos foram clonados virologicamente e designados como PE515nc (não-citopático) e PE515c (citopático), e posteriormente outro par de biótipos (Mc474nc e Mc474c) foi isolado de outro caso espontâneo da doença das mucosas. Foi evidenciado na reprodução experimental que da mesma forma que ocorreu com os biótipos PE515nc e PE515c, a infecção fetal com o biótipo NCP Mc474nc, e a posterior superinfecção do bezerro com o biótipo CP, também resultou na doença das mucosas. Testes de neutralização realizados nos pares isolados causadores de cinco surtos da doença das mucosas demonstraram a existência de estreita relação antigênica entre os biótipos de cada par (Howard et al. 1987).

A imunotolerância que possibilita a persistência do biótipo NCP do BVDV também falha em reconhecer a superinfecção com o biótipo CP. Dessa forma, ambas as cepas causadoras da doença das mucosas são “homólogas” para a imunotolerância. Assim, falhas na reprodução experimental da enfermidade (Harkness et al. 1984) podem ser por ausência de homologia entre os dois biótipos. Isso foi evidenciado em um experimento, no qual animais persistentemente infectados foram deliberadamente desafiados com biótipos CP heterólogos, isolados de surtos diferentes da doença das mucosas. Após duas a três semanas do desafio com o vírus heterólogo, não foi observado o desenvolvimento da doença das mucosas, entretanto, observou-se a produção de anticorpos (Brownlie et al. 1987). O vírus heterólogo superinfectante foi reconhecido e não tolerado pelo sistema imune, o que demonstra a necessidade da imunotolerância para a persistência do vírus e explica a presença de anticorpos por alguns animais persistentemente virêmicos.

Assim, a hipótese para a etiologia da doença das mucosas foi modificada, por necessidade de o biótipo superinfectante CP ser homólogo ao biótipo NCP causador da infecção persistente, para resultar na enfermidade fatal (Brownlie 1990).

O período de incubação variou de 98 a 138 dias, e o vírus CP foi recuperado e produziu a doença das mucosas dentro de três semanas, quando utilizado para provocar superinfecção em outros bezerros com infecção persistente. Não foi determinado se o biótipo CP resultou do biótipo heterólogo utilizado, inicialmente, para a superinfecção por mutação ou recombinação (Brownlie et al. 1987).

A doença das mucosas pode apresentar diferentes formas clínicas (Baker 1995), as quais serão discutidas a seguir. Essas diferenças estão relacionadas aos biótipos CP e NCP, os quais podem ser responsáveis por variações no quadro clínico. Essas manifestações podem variar desde a ocorrência da doença das mucosas aguda, na qual o biótipo CP possui estreita homologia com o biótipo NCP que causou a infecção persistente, até a não ocorrência de sinais clínicos, havendo apenas a soroconversão, naqueles casos em que o biótipo CP é heterólogo ao biótipo NCP causador da infecção persistente. Entre esses dois extremos das manifestações clínicas, podem ocorrer outras formas de manifestação da doença das mucosas (a doença das mucosas crônica e a doença das mucosas seguida de recuperação do animal), as quais são determinadas pelo parentesco entre os biótipos NCP e CP (Grooms et al. 2002). Uma forma de aparecimento retardado da doença das mucosas foi descrita após a vacinação dos animais e atribuída à recombinação genética entre os genótipos 1 e 2 do BVDV (Ridpath & Bolin 1995). Como o nome sugere, essa forma da doença das mucosas ocorre após o tempo esperado para o surgimento dos sinais clínicos, após a exposição de um animal PI a uma fonte exógena do biótipo CP do BVDV. Embora biótipo seja heterólogo ao biótipo NCP causador da infecção persistente, a recombinação genética entre os dois vírus resulta em um vírus CP que é antigenicamente idêntico ao biótipo NCP residente, e o animal desenvolve a doença das mucosas.

3.11.2 Doença das Mucosas Aguda

Essa forma da doença tem manifestação esporádica, afetando menos de 5% do rebanho. Geralmente os animais afetados são da mesma faixa etária e são todos bezerros PI que estavam infectados com o mesmo biótipo NCP do BVDV. Em casos raros, surtos afetando até 25% dos animais de um rebanho podem ser observados, mas para que isso

ocorra é necessário um número elevado de animais PI no rebanho (Grooms et al. 2002). Geralmente a doença afeta animais de 6 a 24 meses de idade.

O período de incubação da forma aguda da doença das mucosas é de 10 a 14 dias após a exposição ao biótipo CP do BVDV. Os sinais clínicos são febre bifásica, anorexia, taquicardia, polipnéia, diminuição na produção de leite e diarreia profusa ocasionalmente sanguinolenta, com moldes de fibrina e odor fétido. As papilas orais podem apresentar aspecto rombo, e na língua, palato, superfícies bucais e faringe podem aparecer erosões. Lesões erosivas também podem estar presentes no espaço interdigital, nos tetos e na vulva. Todas essas lesões erosivas podem evoluir para ulcerativas e diftéricas, dependendo da duração da enfermidade. Outros sinais, como descargas nasais e oculares, opacidade da córnea, salivação excessiva, diminuição dos movimentos ruminais e timpanismo, podem ser observados. Inflamação do rodete coronário, e em alguns casos laminite, pode ocorrer em alguns bovinos. Neutropenia sem desvio à esquerda e trombocitopenia podem estar presentes e infecções bacterianas secundárias responsáveis por pneumonias, mastites e metrites são comuns. Os bovinos com a doença das mucosas tornam-se progressivamente desidratados e debilitados e geralmente morrem dentro de 3 a 10 dias. Alguns animais sobrevivem à fase aguda, mas evoluem para a forma crônica da enfermidade (Grooms et al. 2002).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras doenças que cursam com lesões orais e diarreia, como a peste bovina e febre catarral maligna. Doenças que causam lesões orais, mas não causam diarreia, como a febre aftosa, a estomatite vesicular e a estomatite papular, também devem ser consideradas. Dentre as enfermidades que causam diarreias estão a deficiência de cobre/molobidenose, a paratuberculose, parasitoses gastrintestinais e salmonelose (Grooms et al. 2002). Deve-se ter especial atenção no diagnóstico diferencial com plantas nefrotóxicas, as quais podem causar diarreias, às vezes sanguinolentas, associadas a lesões orais e na mucosa do esôfago, secundárias à uremia, por exemplo, a intoxicação por *Amaranthus spinosus* (Lemos et al. 1993).

3.11.3 Doença das mucosas crônica

Alguns bovinos que desenvolvem a doença das mucosas não morrem no tempo esperado e manifestam uma forma crônica da enfermidade. Esses animais apresentam retardo no desenvolvimento e podem ter fezes persistentemente pastosas ou diarreia

intermitentes, timpanismo crônico, diminuição do apetite, perda de peso, erosões no espaço interdigital e lesões ulcerativas na pele que não cicatrizam. Descarga nasal e ocular persistente são manifestações clínicas comuns. Áreas de alopecia e hiperqueratinização da pele, tipicamente na região cervical, podem ocorrer. Alguns animais podem desenvolver claudicação de longa duração por causa da laminite, necrose no espaço interdigital e deformidades dos cascos. Os animais com a forma crônica da doença das mucosas podem ser persistentemente anêmicos e trombocitopênicos, e raramente sobrevivem por mais de 18 meses e morrem após debilitação acentuada (Grooms et al. 2002). Essa forma de enfermidade deve ser diferenciada das manifestações apresentadas por bezerros que nascem PI com o BVDV e apresentam prejuízo no desenvolvimento (Grooms et al. 2002).

A ocorrência da dermatite é comum na doença das mucosas (Wilhelmsen et al. 1991); é encontrado em biópsia de pele de animais PI confirmando o tropismo do vírus pelo epitélio (Braun et al. 1996). Foram descritos casos de dermatite generalizada em que o BVDV foi isolado e outras possíveis etiologias não foram identificadas (Odeon et al. 2003). Nesses surtos antígenos de BVDV foram encontrados em áreas de dermatite exsudativa indicando o tropismo do vírus para as células epiteliais. Considerando que a ocorrência de lesões de pele, na ausência de alterações no sistema digestivo, não é uma manifestação típica nem da infecção aguda pelo BVDV, nem de doença das mucosas, pode-se sugerir a existência de relação entre as lesões observadas e a virulência desses isolados particularmente (Odeon et al 2003).

3.11.4 Doença das mucosas seguida por recuperação

A ocorrência de vários animais PI que manifestaram sinais transitórios da doença das mucosas com recuperação posterior é descrita (Edwards et al. 1991). Segundo esses relatos, os animais permanecem saudáveis até serem abatidos. Essa observação é interessante, e casos da doença das mucosas seguidos de recuperação são possíveis, de acordo com o conhecimento atual sobre a patogenia das doenças das mucosas (Grooms et al. 2002).

3.11.5 Dermatite

Surto de BVDV, nos quais a dermatite foi a principal manifestação clínica, foram recentemente descritos (Odeon et al. 2003). Apenas bezerros foram afetados e a

morbidade variou de 4,1% a 10%. A dermatite caracterizou-se por lesões crostosas ao redor do focinho, nas orelhas e pálpebras por dermatite generalizada, mais severa nas axilas, períneo e virilha. Outros sinais, como ataxia, febre (40,5°C) e angústia respiratória, podem ser observadas. O curso clínico pode ser prolongado, até 30 dias, e a letalidade é variável, mas pode ser superior a 30%.

4 ACHADOS DE NECROPSIA

As lesões macroscópicas presentes em animais que morrem de infecções causadas pelo BVDV variam de acordo com a forma da enfermidade.

4.1 Doença das mucosas

Os animais que morrem da doença das mucosas geralmente apresentam lesões severas caracterizadas por erosões e ulcerações na boca, língua, esôfago, piloros do rúmen, omaso, abomaso, intestino e ceco. As lesões erosivas podem se estender à face externa do focinho e ao interior da cavidade nasal. As ulcerações típicas da doença que ocorrem no esôfago são alongadas. No intestino delgado, as placas de Peyer geralmente estão evidenciadas à inspeção da serosa e à abertura do intestino e apresentam-se necróticas, hemorrágicas e algumas vezes recobertas com fibrina. O conteúdo intestinal é aquoso, sanguinolento e malcheiroso. As alterações macroscópicas podem estar ausentes ou ser muito discretas em animais com a forma crônica da enfermidade, embora, nesses casos, as alterações histológicas estejam presentes. Geralmente são encontradas lesões de pele que se caracterizam por hiperqueratose coalescente ao redor da nuca, na paleta e região perineal. Lesões erosivas afetando a região perineal, o prepúcio e espaço interdigital e a banda coronária dos cascos também podem estar presentes. As lesões de pele são observadas com maior frequência em animais acometidos pela forma crônica da enfermidade (Grooms et al. 2002).

4.2 Infecção aguda pelo BVDV

Os animais que morrem pela infecção aguda pelo BVDV apresentam lesões menos acentuadas, embora, em alguns, todas as alterações descritas anteriormente na doença das mucosas possam estar presentes. Geralmente são observadas alterações ocasionadas por infecções bacterianas secundárias, como pneumonias ou mastite, as

quais contribuem para a morte do animal. Os animais que morrem de síndrome hemorrágica podem apresentar evidências de hemorragia em muitos órgãos, incluindo o sistema gastrointestinal, o cardiovascular, o respiratório e o urinário. Petéquias ou equimoses, geralmente, são observadas na superfície das mucosas e hemorragias significativas podem estar presentes nas submucosas do trato gastrointestinal e nas placas de Peyer (Grooms et al. 2002).

4.3 Abortos e defeitos congênitos

O aborto ocorre como resultado da infecção intra-uterina e os fetos abortados na maioria das vezes estão autolizados. As lesões observadas, tanto nos fetos quanto nas placentas respectivas, são inespecíficas. Em condições experimentais, quando os fetos são expelidos, imediatamente, após a morte, as lesões observadas são conjuntivite, pneumonia perialveolar e peribronquial, além de miocardite não específica. Diminuição significativa na massa cerebelar pode ser evidente naqueles bezerros que apresentam hipoplasia cerebelar, a qual resulta da infecção pelo BVDV, no segundo trimestre da gestação. Outros defeitos congênitos comumente associados com a infecção pelo BVDV e que podem ser observados durante a necropsia são a catarata, a hipoplasia do timo, hidrocefalia, bragnatia, hipoplasia pulmonar e anormalidades ósseas (Grooms et al. 2002).

5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de infecção pelo BVDV pode ser realizado por meio de avaliação sorológica, isolamento viral, detecção de antígenos e anticorpos virais e detecção do ácido ribonucléico (RNA) viral, utilizando métodos de ampliações dele, como a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR, sigla em inglês de Polymerase Chain Reaction).

5.1 Isolamento viral

È o método mais freqüentemente utilizado para a identificação de bovinos com BVDV. Sangue com anticoagulante é o mais utilizado para o isolamento do vírus em bovinos persistentemente infectados e com infecção aguda. Em bovinos vivos, a

diferenciação dos bovinos PI daqueles com infecção aguda requer uma série de isolamentos do vírus com intervalos de pelo menos duas semanas. Em animais mortos, o BVDV é isolado do tecido linfóide, das placas de Peyer, baço, timo, linfonodos, fetos, envoltórios fetais, além de órgãos ou tecidos com lesões macroscópicas. Para isolamento viral, os órgãos ou tecidos devem ser remetidos em gelo e o sangue totalmente congelado (Flores & Schuch 2007).

O BVDV é isolado por inoculação de amostras apropriadas em cultivos de células de bovinos. Uma vez isolado o vírus, este deve ser caracterizado como citopático ou não-citopático pela presença ou ausência do efeito citopático característico no cultivo celular. Os isolados não-citopáticos são identificados no cultivo celular pela imunofluorescência (IFA) e/ou imunoperoxidase (IPX) (Grooms et al. 2002).

5.2 Detecção do antígeno e anticorpo viral

O vírus pode ser demonstrado em amostras de tecidos, fixadas em formol tamponado a 10%, pelo uso da IFA, IPX ou IHQ. A imunistoquímica tem sido descrita como uma prova mais acurada do que o isolamento viral e a IFA no diagnóstico dos casos de aborto e morte perinatal (Ellis et al. 1995). O BVDV também pode ser identificado em amostras de sangue utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, sigla em inglês de Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de captura, o qual é equivalente em sensibilidade ao isolamento viral para a identificação de animais PI, mas menos sensível para a identificação de infecção aguda pelo BVDV (Saliki et al. 1997).

A IHQ é um método sensível e específico para a detecção de antígenos do BVDV em bovinos afetados (Brodersen 2004). Em animais PI, a pele demonstrou ser um tecido no qual o BVDV é freqüentemente encontrado pela IHQ, possuindo a vantagem de ser uma amostra de fácil obtenção (Lertora et al. 2003, Brodersen 2004). A IHQ dos bulbos pilosos também tem sido estudada com resultados positivos.

A IHQ demonstrou ser uma técnica capaz de diferenciar bovinos PI dos não persistentemente infectados, previamente diagnosticados pelas técnicas de ELISA, PCR e isolamento viral (Lertora et al. 2002, Lertora et al. 2003). A IHQ também apresenta vantagens quando comparada a outras técnicas; as amostras fixadas em formol são estáveis em comparação com o sangue, evitando falso-negativos por autólise. Também é possível diferenciar bovinos PI de bovinos com infecção aguda em uma única amostra, assim como analisar bezerros neonatos, uma vez que os anticorpos colostrais

não interferem na técnica (Grooms & Keilen 2002, Lertora et al. 2003, Brodersen 2004).

Na maioria dos casos, animais com infecção aguda não evidenciam uma quantidade significativa de antígeno no tecido cutâneo (Njaa et al. 2000, Brodersen 2004, Salik & Dubovi 2004), e quando ocorre uma marcação positiva pelo IHQ nesses casos, ela é discreta (Njaa et al. 2000). A presença de antígeno do BVDV em biópsia de pele é uma forte evidência da presença do vírus no rebanho por um tempo prolongado, indicando a presença de um animal PI (Salik & Dubovi 2004), oportunizando o estudo da epidemiologia da enfermidade quando animais PI estão presentes no rebanho (Loneragan et al. 2005).

A IHQ demonstrou ser eficaz no diagnóstico da infecção pelo BVDV tanto em bovinos com quadro clínico e patológico sugestivo de infecção como no diagnóstico ao aborto nessa espécie de animal (Schimiz 2006). Nesse estudo, todas as biopsias de pele dos bovinos infectados foram positivas na IHQ, e o BVDV também foi encontrado no cérebro e no cerebelo de quatro dentre seis bovinos analisados por essa técnica, os quais não apresentavam sinais de distúrbios neurológicos. Esses achados indicam que o cérebro e o cerebelo podem ser considerados importantes para a detecção do antígeno do BVDV, mesmo quando os bovinos não manifestam sinais nervosos.

O diagnóstico sorológico é geralmente realizado pela técnica de soroneutralização (SN) ou ELISA. A sorologia com amostras únicas, não pareadas, tem valor diagnóstico limitado nas infecções pelo BVDV, pois indica apenas que houve exposição prévia. Exames sorológicos de rebanhos, por causa da prática de vacinação, têm valor epidemiológico limitado, e servem unicamente para verificar o *status* sorológico e a possível presença do vírus no rebanho. A detecção e quantificação de anticorpos em amostras de leite têm sido utilizadas para a identificação de rebanhos com atividade viral (Flores & Schuch 2007)

Um problema enfrentado no diagnóstico é a falta de padronização dos testes de diagnóstico e variações nos resultados são descritos. Amostras (soro, sangue total e biópsia) de quatro animais (dois negativos e dois PI) foram enviadas a 23 laboratórios que utilizavam um protocolo padrão. Nas biopsias, o antígeno enzimático de captura (ACE) teve grande acerto em determinar as amostras positivas e conformidade entre os laboratórios. A reação de transcrição reversa da cadeia de polimerase (RT-PCR) e a IHQ tiveram um bom desempenho, identificando um número maior ou igual a 85% das

amostras positivas. O isolamento viral teve baixa consistência em determinar amostras positivas e baixa conformidade entre os laboratórios (Edmondson et al. 2007).

Em outro relato foram analisadas em um mesmo laboratório, biopsias e soro de 224 bezerros com idade entre 0 e 3 meses, 23 entre 3 e 7 meses e 11 com mais de 7 meses por cinco métodos diferentes para detecção do BVDV. Vinte e seis amostras foram positivas e nove das 258 amostras produziram resultados discordantes, dentre estas, três casos foram de infecção transitória, duas amostras foram interpretadas como falso-positivas pela RT-PCR, o que foi atribuído à contaminação. O antígeno comercial ELISA 2 falhou na detecção de dois bezerros positivos por causa da presença de anticorpos maternos, e dois casos de falso-positivos neste ELISA permaneceram indeterminados. O trabalho concluiu que o antígeno comercial ELISA 2, o anticorpo comercial ELISA 1, a IHQ e a RT-PCR de tempo real utilizados paralelamente possuem altas taxas de correlação (96,5%) e valores similares de sensibilidade e especificidade (Hilbe et al. 2007).

6 TRATAMENTO, PROFILAXIA E CONTROLE

Não há tratamento específico para os animais que manifestam sinais clínicos decorrentes da infecção pelo BVDV. As formas severas da doença das mucosas geralmente são fatais. Os objetivos da terapia de bovinos suspeitos de estarem com infecção aguda pelo BVDV são fornecer terapia de suporte ao animal e prevenir infecções secundárias, principalmente causada por bactérias. Antibióticos de amplo espectro de ação, fluidos, eletrolíticos e vitaminas também podem ser indicados (Grooms et al. 2002).

As medidas práticas empregadas para prevenir a introdução do BVDV em um rebanho são aplicadas apenas àqueles rebanhos “fechados” (que não realizam a compra sistemática de animais). Sistemas de biossegurança restritos, com o isolamento e a realização de testes diagnósticos em todos os animais que serão introduzidos no rebanho, são necessários para impedir a introdução do vírus, e isso pode ser difícil na maioria das propriedades que realiza a compra de animais, principalmente bovinos jovens. Um compromisso razoável é a limitação da movimentação de animais da fazenda ao trânsito essencial nela, evitando a movimentação de vacas prenhes e a aquisição de animais de reposição (incluindo novilhas com finalidade reprodutiva) de

rebanhos que possuem relatos acurados do histórico natural da enfermidade e de programas de vacinação.

O isolamento dos animais adquiridos por um período de três semanas pode evitar a transmissão do vírus a partir de animais com infecção aguda, mas não por meio de animais PI. Desse modo, todos os animais adquiridos devem ser testados para o BVDV (isolamento viral ou detecção de antígenos virais) antes de entrarem no rebanho. No caso de aquisição de vacas prenhes, os bezerros nascidos destas devem ser testados para assegurar que são livres de BVDV. O sêmen utilizado em programas de inseminação artificial deve ser de touros que tenham sido testados e apresentem resultados negativos para a infecção pelo BVDV. Também, é importante testar as vacas receptoras de embriões, antes de sua introdução em programas de transferência de embriões, para assegurar que elas não são PI. A exposição de bovinos a pequenos ruminantes domésticos e selvagens deve ser reduzida, por meio da construção de baias separadas dos bovinos, para abrigar ovinos e caprinos e cercas que evitem o contato com cervídeos (Grooms et al. 2002).

Métodos de coleta e exame de fluidos fetais de vacas prenhes, para exame visando à identificação de fetos PI antes do seu nascimento, estão sendo desenvolvidos com a finalidade de serem utilizados em programas de erradicação e controle do BVDV (Stokstar et al. 2003).

Em outros países, como os Estados Unidos, programas de vacinação são utilizados rotineiramente, para limitar a infecção pelo BVDV. A meta desses programas de vacinação é induzir a imunidade que limitará a replicação viral após os efeitos subseqüentes à infecção. Tanto em rebanhos leiteiros como em rebanhos de corte que realizam a compra de bezerros, a obtenção de uma imunidade adequada nas fêmeas é desejável para prevenir a infecção intra-uterina e seus efeitos (infertilidade, abortos, defeitos congênitos, nascimento de animais fracos e infecção persistente). Um benefício adicional de vacinação anual do rebanho (principalmente fêmeas em reprodução) é o aumento do nível de imunidade colostrar (Grooms et al. 2002).

Em confinamentos no Canadá, a imunização para o BVDV tem demonstrado efeito protetor contra o complexo respiratório dos bovinos (Martin & Bohac 1986). A vacinação contra o BVDV antes do momento esperado para o aparecimento de doenças respiratórias, como é preconizado em programas de pré-condicionamento para o confinamento, pode minimizar as conseqüências que acompanham a infecção com

cepas de campo do BVDV. Desse modo, reduzir a gravidade de outros patógenos envolvidos na doença respiratório dos bovinos (Grooms et al. 2002).

Vacinas inativadas para o BVDV são seguras para o uso em vacas gestantes não resultando em “surto vacinal” ou imunossupressão, a menos que tenham sido imprópriamente inativadas. Quando são utilizadas vacinas inativas em animais que nunca foram anteriormente vacinados para o BVDV, deve-se realizar o reforço vacinal duas a quatro semanas após a primeira vacinação (Grooms et al. 2002).

As dúvidas a respeito da eficácia da utilização das vacinas inativadas têm se concentrado principalmente na capacidade para estimular uma resposta imune capaz de proteger os animais contra o amplo espectro antigênico representado pelos genótipos 1 e 2 do BVDV. As vacinas utilizadas atualmente parecem ser capazes de prevenir manifestações severas da enfermidade em bovinos infectados com cepas de campo heterólogas às presentes nas vacinas (Cortese et al. 1998). Entretanto, a capacidade das vacinas para proteger contra a infecção fetal não está clara (Meyling et al. 1987 citados por Grooms et al. 2002). Pesquisas a esse respeito têm demonstrado que a exposição a cepas de campo do BVDV, antes da estação de monta, pode proteger os fetos da infecção com cepas homólogas ao vírus.

Outro estudo, no qual as vacas foram vacinadas com vacinas inativadas, antes da monta, e desafiadas com cepas heterólogas durante a gestação, demonstrou que houve apenas proteção parcial ou incompleta dos fetos contra a infecção (Markness et al. 1987 citados por Grooms et al. 2002). Resultados similares foram observados utilizando vacinas vivas modificadas (Cortese et al. 1998). Os resultados desses estudos sugerem que uma vacina para o BVDV não produz proteção completa contra a infecção transplacentária em condições de campo, principalmente se as cepas de campo e a presente na vacina são antigenicamente diferentes. Apesar dessas dúvidas, parece que a vacinação contra o BVDV é o melhor método de controle dos efeitos nocivos da replicação viral. As vacinas para o BVDV devem ser utilizadas, estrategicamente, para otimizar a imunidade durante a gestação, especialmente durante o primeiro e segundo trimestres quando o feto está mais suscetível aos efeitos prejudiciais do vírus.

Desse modo, todas as fêmeas em reprodução devem ser vacinadas antes da estação reprodutiva. As fêmeas de reposição devem ser vacinadas entre os cinco e seis meses de idade, no momento em que ocorre o declínio da imunidade colostrar, e revacinadas antes da estação de monta. Quando possível utilizar vacinas vivas atenuadas, proibidas no Brasil, com o objetivo de conferir proteção mais abrangente e

duradoura. Nos rebanhos em que são utilizadas apenas vacinas inativadas, as vacas devem ser vacinadas antes da monta, durante a lactação e também após o desmame (período seco). Nos bezerros, a vacinação antes do declínio dos anticorpos colostrais é questionável, embora alguns estudos indiquem que há um efeito protetor contra a doença de bezerros associada ao BVDV (Cortese et al. 1998). Em países nos quais o BVDV é uma causa importante de perdas econômicas, a vacinação contra o BVDV deve ser parte de um programa de pré-condicionamento para bezerros de corte que serão introduzidos em ambientes nos quais há mistura de animais de diversas origens (Grooms et al. 2002).

A principal preocupação em relação à eficácia das vacinas é com a grande variabilidade antigênica do vírus. Estudos desenvolvidos no Brasil demonstram que, além da diversidade antigênica entre os isolados locais, elas possuem baixa reatividade sorológica cruzada com as cepas norte-americanas utilizadas nas vacinas. Isso gerou questionamentos sobre a eficácia dessas vacinas, quando utilizadas nas condições brasileiras e sobre a necessidade de se reavaliar as estratégias de produção, licenciamento e utilização de vacina contra o BVDV no Brasil (Flores et al. 2005).

Três vacinas inativadas contra o BVDV comercializadas no Brasil foram avaliadas quanto a sua eficácia em bovinos e ovinos. O estudo em bovinos limitou-se a avaliar a resposta sorológica, diante de cepa-padrão de diferentes isolados brasileiros de BVDV-1 e BVDV-2. Os títulos de anticorpos induzidos foram baixos a moderados, principalmente diante dos isolados brasileiros de BVDV-2. O estudo em ovinos avaliou a capacidade dessas vacinas em proteger os fetos ante ao desafio com os isolados do BVDV-1 e BVDV-2, e elas não foram capazes de proteger os fetos da infecção (Vogel et al. 2001, Vogel et al. 2002).

Em outros estudos no Brasil (Brum et al. 2002, Lima et al. 2004), dois isolados citopáticos do BVDV (tipos 1 e 2) foram atenuados e avaliados como possíveis vírus vacinais. Ambos os tipos demonstraram ser atenuados para bezerros, induziram altos títulos de anticorpos neutralizantes contra BVDV-1 e BVDV-2 e induziram proteção fetal perante o desafio com cepas heterólogas de BVDV em ovelhas prenhes.

Em países que utilizam sistematicamente a vacinação, muitos produtores têm demonstrado inquietações em relação à utilização de vacinas comercializadas para o controle do BVDV. As principais preocupações se referem à segurança das vacinas vivas modificadas, as quais, tradicionalmente, têm sido associadas a surtos vacinais,

transmissões de cepas vacinais, imunossupressão induzida pela vacina, abortos e anormalidades congênitas.

Surtos causados por vacinas ou a ocorrência de epizootias da enfermidade após a vacinação têm sido descritos. A possível explicação para essas epizootias inclui a não atenuação do vírus na vacina (contaminação de vacina), doença causada por uma infecção coincidente com a vacinação, como uma cepa de campo do BVDV, ou a vacinação de animais PI com a indução da doença das mucosas. O aperfeiçoamento dos testes de controle de qualidade das vacinas tem reduzido a ocorrência das contaminações (Grooms et al. 2002).

A formulação de vacinas contendo os dois genótipos do BVDV (cepas do BVDV 1 e BVDV-2), as quais já são produzidas e comercializadas na América do Norte (Fulton & Burge 2000, Cortese 2000) e a formulação de vacinas com amostras de vírus representativas das amostras circulantes na população (Edwards & Paton 1995, Flores et al. 2000) são alternativas para minimizar os efeitos da diversidade antigênica. A realização da revacinação com vacinas contendo vírus heterólogos aos de primovacinação também tem sido sugerida como uma forma de aumentar o espectro de proteção (Fulton et al. 1995), o qual também poderia ser alcançado com a utilização de vacinas vivas atenuadas. Nesse caso, a ampliação do espectro de proteção ocorre provavelmente pela resposta imunológica contra epítopos conservados nas proteínas não estruturais do vírus (Vogel et al. 2002).

Após a elucidação da patogenia da infecção pelo BVDV e do mecanismo de geração de animais PI e de sua importância na epidemiologia da infecção (Browlie 1990), os conceitos sobre proteção vacinal enfatizavam a capacidade de as vacinas conferirem proteção fetal (Dubovi 1992). Entretanto, com o aparecimento das cepas altamente virulentas do BVDV-2, a necessidade de proteção contra a doença clínica voltou a ser enfatizada (Van Oirschot et al. 1999).

Estudos demonstram que rebanhos vacinados regularmente e que mantêm níveis moderados e altos de anticorpos neutralizantes contra cepa vacinal continuam a gerar bezerros persistentemente infectados (Bolin et al. 1991). Esse fato tem sido atribuído à infecção de fêmeas prenhes com amostras antigenicamente diferentes da cepa vacinal. Títulos de anticorpos vacinais de 64 a 256 contra a cepa vacinal podem traduzir-se em títulos de dois ou menos contra amostras antigenicamente diferentes (Bolin et al. 1991). Por causa dessa baixa reatividade cruzada, amostras antigenicamente diferentes,

provavelmente, escapam à neutralização ou são neutralizadas parcialmente pelos anticorpos vacinais, resultando em proteção insuficiente (Flores et al. 2000).

Atividade neutralizante reduzida ou mesmo quase indetectável do anti-soro de três cepas vacinais de BVDV, contra várias amostras de vírus isoladas no Brasil, foi descrita (Flores et al. 2000). Segundo esses autores, essa capacidade neutralizante reduzida foi mais evidente no anti-soro das cepas NADL e Oregon/c24v, e mais acentuada perante as amostras do BVDV-2. A baixa reatividade cruzada entre as cepas vacinais e as amostras brasileiras do BVDV leva ao questionamento sobre o grau de proteção conferido por essas vacinas, e reforça os achados e estudos sorológicos, os quais indicam que uma parcela significativa de animais vacinados contra o BVDV no Rio Grande do Sul apresenta títulos baixos ou indetectáveis de anticorpos neutralizantes mesmo quando testados contra o vírus do mesmo genótipo (Flores et al. 2000). Como as vacinas contra o BVDV atualmente utilizadas no Brasil são inativadas, o que induz resposta imunológica essencialmente humoral, níveis baixos ou indetectáveis de anticorpos neutralizantes provavelmente se traduzem em níveis inadequados de proteção (Flores et al. 2000).

Durante décadas, as vacinas contra o BVDV foram formuladas utilizando apenas uma cepa viral por vacina e os testes de eficácia eram realizados por meio de desafio homólogo alguns meses após a vacinação (Dubovi 1992). Posteriormente, esses conceitos foram reavaliados em virtude da constatação da grande variabilidade antigênica do vírus, das freqüentes falhas na proteção vacinal e principalmente na proteção fetal (Flores et al. 2000).

Em rebanhos nos quais estão ocorrendo problemas causados pela infecção pelo BVDV, a triagem para a identificação de animais PI pode ser justificada. Em rebanhos de cria, os animais PI atuam como uma fonte de infecção contínua para os bovinos suscetíveis. Adicionalmente, por causa de fêmeas PI poderem produzir bezerros PI, é aconselhável o abate dessas fêmeas antes que elas produzam bezerros PI ou que elas adoçam e causem perdas econômicas, mas, antes de se instituir um programa de triagem em um rebanho, vários aspectos devem ser avaliados. O primeiro deve ser um diagnóstico definitivo da infecção pelo BVDV, antes dos gastos com os testes de triagem serem realizados; o segundo, é que o rebanho apresente síndromes que estejam associadas com a infecção pelo BVDV; e o terceiro, é que o proprietário deve estar consciente e capaz de implementar medidas de biossegurança, para reduzir o risco da reintrodução do BVDV no rebanho. Os procedimentos de triagem do rebanho envolvem

o teste de todos os bovinos da propriedade. Aqueles que se encontram em gestação no momento do teste, devem, necessariamente, ser testados após o nascimento. Adaptações do teste de todo o rebanho têm sido propostas, mas sua utilidade ainda não foi comprovada (Grooms et al. 2002).

Em países sem programas de controle, a decisão sobre qual ação preventiva a ser tomada pode ser difícil. Por causa da alta probabilidade de ocorrência de reinfecção do rebanho, existem poucas vantagens de eliminar o vírus se a biossegurança do rebanho não for garantida. É incerto se os rebanhos em áreas com elevada densidade de bovinos podem permanecer livres do BVDV se os seus vizinhos não adotam medidas preventivas. Se a biossegurança não puder ser assegurada, a melhor opção é não tomar medida alguma, ou promover o aumento da imunidade do rebanho por meio de vacinação ou exposição deliberada a animais PI. A retenção dos animais PI e a exposição destes com os demais animais, antes de entrarem na fase reprodutiva, é um meio efetivo de promover o reforço da imunidade do rebanho, mas é difícil prevenir a disseminação do vírus ao restante do rebanho. Adicionalmente, a saúde do rebanho pode ser comprometida e os animais PI podem morrer com a doença das mucosas (Fray et al. 2000).

7 SITUAÇÃO DA INFECÇÃO PELO BVDV NO BRASIL

Existem indicadores da presença e prevalência da infecção pelo BVDV em rebanhos bovinos no Brasil, o que é comprovada tanto por levantamentos sorológicos como pelo isolamento do vírus em fetos de abatedouros e casos clínicos da enfermidade nas subpopulações estudadas (Flores et al. 2005).

Nos levantamentos sorológicos, a prevalência da infecção variou de 50% a 70%, mas esses dados deveriam ser interpretados com cautela, porque as técnicas utilizadas não eram padronizadas, algumas amostras eram viciadas, outras muito pequenas, bem como porque a maioria dos estudos desconsiderou a possibilidade de que parte da sorologia positiva pode ser por vacinação (Flores et al. 2005).

Estudos também detectaram sorologia positiva em outras espécies, como em suínos (Roehle et al. 1998), javalis cativos no Estado do Rio Grande do Sul (Flores 2005), caprinos (Castro et al. 1994), em bubalinos no Estado de São Paulo (Pituco et al. 1997) e em cervos na divisa entre os Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo (Alfieri 2001 citado por Flores et al. 2005).

Levantamento sorológico realizado no Rio Grande do Sul, utilizando a técnica de ELISA em 430 bovinos adultos de 19 fazendas, demonstrou a presença de anticorpos em 56% ($\pm 15,1\%$) das amostras testadas, indicando que, nessa região do Brasil, a prevalência da infecção pelo BVDV é similar à observada na Europa e nos Estados Unidos (Canal et al. 1998).

Os isolados brasileiros possuem grande variabilidade antigênica e, aproximadamente, mais de 50 isolados do vírus já foram caracterizados genética e/ou antigenicamente, e muitos aguardam caracterização. Isso é prejudicado pelo reduzido número de laboratórios que realizam isolamento do BVDV como rotina diagnóstica no Brasil (Flores et al. 2005). A maioria pertence ao genótipo BVDV-1, biótipo não-citopático, mas vários isolados de BVDV-2 e alguns biótipos citopáticos também foram identificados de fetos bovinos, de sangue de animais clinicamente saudáveis de rebanhos com problemas reprodutivos e de casos clínicos de enfermidade gastrintestinais (Botton et al. 1998).

Buscando animais PI, Oliveira (1996) realizou triagem em rebanhos com problemas reprodutivos no Rio Grande do Sul, encontrando 1,2% (12/1.240) amostras positivas. Em amostras de soro de 1.396 fetos sadios coletados em matadouros, foram detectados antígenos em 19 (1,36%) e vírus em 11 (0,79%) (Botton et al. 1998).

Utilizando a técnica de soroneutralização adaptada para detecção de anticorpos no leite, 11.711 rebanhos foram examinados no Rio Grande do Sul, detectando-se 1.028 rebanhos com títulos neutralizantes e 180 propriedades com indicativo de infecção ativa e/ou a presença de animais PI (Brum et al. 2004).

Por causa da importância do constante monitoramento de centrais de inseminação artificial, o exame de 696 ejaculados por PCR ou isolamento foi realizado pelo Instituto Biológico de São Paulo, que revelou 14 (2,01%) amostras positivas (Flores et al. 2005).

O BVDV-2 foi isolado em dois casos da enfermidade gastrintestinal/respiratória no Rio Grande do Sul. Os vírus foram isolados de duas novilhas de diferentes rebanhos. Uma delas apresentou enfermidade aguda caracterizada por anorexia, atonia ruminal, diarreia escura ou mucossanguinolenta, tenesmo e descarga nasal mucopurulenta. O outro animal desenvolveu enfermidade de curso crônico (sete meses), caracterizada por retardo no crescimento, anorexia, quadros recorrentes de diarreia, dermatite interdigital, hemorragias digestivas e genitais ocasionais, conjuntivite, artrite e pneumonia crônica. Os principais achados de necropsia consistiam de congestão disseminada das mucosas,

ulcerações extensivas e profundas na língua, palato e esôfago, áreas necróticas na mucosa do rúmen, áreas de congestão e ulcerações cobertas por fibrina no intestino delgado. As amostras isoladas do BVDV-2 eram não-citopáticas, e, além do isolamento viral, antígenos do BVDV foram demonstrados por imunistoquímica no epitélio da língua, nos pulmões e em linfonodos mesentéricos (Flores et al. 2000). A enfermidade foi reproduzida experimentalmente por meio da inoculação dessa amostra do BVDV em bezerros (Brum et al. 2002).

Casos sugestivos de hipoplasia cerebelar e porencefalia em bovinos charolês, causada pela infecção pelo BVDV, são descritos no Rio Grande do Sul (Schild et al. 2001).

Tanto a presença de anticorpos quanto o isolamento do BVDV foram observados em estudo realizado em soros fetais comercializados para utilização como suplementos em cultivos celulares (Oliveira et al. 1996).

O BVDV foi isolado recentemente no Estado de Mato Grosso do Sul em um rebanho de bovinos de corte, o qual se destina principalmente à recria de bezerros com o objetivo de formação de touros. O isolamento foi realizado em um animal de dois anos de idade, que apresentou crescimento retardado, emagrecimento progressivo, dermatite interdigital, discreta dermatite exsudativa no pescoço, ulceração no focinho e quadros recorrentes de diarreia. Durante a necropsia, a principal alteração observada foi a presença de numerosas ulcerações longitudinais na mucosa do esôfago. O quadro clínico apresentou evolução de um mês e o animal foi submetido à eutanásia em estado terminal (Oliveira 2003).

Outros dois casos de doença das mucosas crônica foram diagnosticados em um rebanho de bovinos de corte criados extensivamente em Mato Grosso do Sul, mas, diferentemente dos casos descritos na literatura, eles apresentaram dermatite generalizada severa, o que motivou este autor a acompanhar os dados zootécnicos da propriedade, utilizar novas técnicas para identificação de animais PI e descrever os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos da doença por meio de uma publicação científica.

8 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi descrever a epidemiologia, sinais clínicos, patologia e diagnósticos laboratoriais de dois casos de doença das mucosas associados à

dermatite generalizada severa em um rebanho de bovinos de corte criados extensivamente no Estado de Mato Grosso do Sul. Também foram abordadas as metodologias para identificação de bovinos PI e o impacto causado pela doença nos índices zootécnicos nesse rebanho.

REFERÊNCIAS

- Alenius S., Jacobsen S.O & Cafaro E., 1986. Frequency of bovine viral diarrhoea virus infection in Sweden among heifers selected for artificial insemination. Proc. World Congr. Diseases of Cattle 14: 204-207.
- Alves D., Mcewen B., Tremblay R., Godkin A., Anderson N., Carman S., Hazlett M. & Van Dreumel T. 1996a. Population diagnostics from an epidemic of bovine viral diarrhoea in Ontario. In: Int. Symp. Bovine Viral Diarrhea Virus, a 50 year review. Cornell University. College of Veterinary Medicine. 71-74.
- Alves D., Tremblay R., Godkin A., Anderson N., Carman S., Mcewen B. & Hazlett M., 1996b. Update on bovine virus diarrhoea in Ontario. Can. Vet. J. 37:177.
- Barber D.M.L. & Nettleton P.F. 1993. Investigations into bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. Vet. Rec. 133:549-550.
- Bak A., Callesen H., Meyling A. & Greve T. 1992. Calves born after embryo transfer from donors persistently infected with BVD virus. Vet. Rec. 131:37.
- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11(3): 425-45.
- Bielanski A. & Jordan L. 1996. Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an in vitro fertilization system. Theriogenology. 46:1467-1476.

- Bitsch V. & Ronsholt L. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without application of vaccines. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11:627-640.
- Bolin S.R., Mcclurkin A.W., Cutlip R.C. & Coria M.F. 1985a. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46:573-576.
- Bolin S.R., Mcclurkin A.W. & Coria M.F. 1985b. Effects of bovine viral diarrhoea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46:884-886.
- Bolin S.R., Littledike E.T. & Ridpath J.F. 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Res.* 52:1033-7.
- Bolin S.R. 1995. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North Amer.* 11(3):615-625.
- Bolin S.R. & Ridpath J.F. 1996. The clinical significance of genetic variation among bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Med.* 91:958-961.
- Botton S.A., Gil L.H.G., Silva A.M., et al. 1998. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18:84-92.
- Braun U., Thur B., Weiss M. & Giger T. 1996. Bovine virus diarrhoea/mucosal disease in cattle-clinical findings in 103 calves and cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 138:465-476.
- Braun U., Landolt G., Brunner D. & Giger T. 1997. Epidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von BVD/MD bei 2892 Rindern in 95 Milchviehbetrieben. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde.* 139:172-176.

- Brock K.V., Redman D.R., Vickers M.L. & Irvine N.E. 1991. Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3:99-100.
- Brock, K.V., Lapin, D.R. & Skrade, D.R. 1997. Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology.* 47:837-844.
- Brodersen B.W. 2004. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20(1):85-93.
- Brown G.B. 1991. Defective function of leukocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus and the influence of recombinant cytokines. *Am. J. Vet. Res.* 52:381-387.
- Brownlie J., Clarke M.C. & Howard C.J. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 114:535-6.
- Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. & Pocock D.H. 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vet.* 18:157-166.
- Brownlie J. 1990. The patogenesis of bovine viral diarrhea virus infection. *Rev. Sci. Tech. OIE* 9:43-59.
- Brum M.C.S., Scherer C.F.C., Flores E.F., Weiblein R., Barros C.S.L. & Langohr I.M. 2002. Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da diarréia viral bovina tipo 2 (BVDV-2). *Ciência Rural. Santa Maria.* 31(5):803-820.
- Brum L.P.B., Flores E.F., Weiblein R., Scherer C.F.C., Kreutz L.C., Kreutz L.C., D'urr J.W., Quadros V.L., Mazzuti K.C. & Pan K.A. 2004. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia Viral Bovina (BVDV) em amostras de tanques de leite de rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, RS. *Rev. Bras. Cienc. Vet.* 11(1/2):84-87.

- Canal C.W., Strasser M., Hertig C., Masuda A. & Peterhans E. 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63:85-97.
- Carlsson, U. 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 128:145-147.
- Carlsson, U. & Belák, K. 1994. Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet. Scand.* 35:79-88.
- Carman S. 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:27-35.
- Castro R. S., Silva F.A.G., Frutuoso E.M. & Nascimento S.A. 1996. Anticorpos contra pestivirus e herpesvírus no estado de Pernambuco. *Anais XXIII Congr. Bras. Med. Veterinária. Olinda. Pernambuco.* 252.
- Cook L.G., Littlejohns I.R. & Jessep T.M. 1990. Induced sero-conversion in heifers with a field strain of bovine pestivirus – a comparison of methods and doses. *Aust. Vet. J.* 67:393-395.
- Corapi W.V., French T.W. & Dubovi E.J. 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 63(9):3934-3943.
- Corapi W.V. 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:590-596.
- Coria M.F. & McClurkin A.W. 1978. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172:449-51.

- Cortese V.S., Grooms D.L., Ellis J., et al. 1998. Protection of pregnant cattle and fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 59: 1409-1413.
- Cortese V.S. 2000. Type 2, too! Bovi-Schield now with proven protection against type 1 and type 2 BVD. *Topics in Veterinary Medicine.*10:14-20.
- Cutlip R.C., McClurkin A.W. & Coria M.F. 1980. Lesions in clinically healthy cattle persistently infected with the virus of bovine viral diarrhoea-glomerulonephritis and encephalitis. *Am. J. Vet. Res.* 41:1938-1941.
- David G.P., Crawshaw T.R., Gunning R.F., Hibberd R.C., Lloyd G.M. & Marsh P.R. 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet. Rec.* 134:468-472.
- Dubovi E.J. 1992. Genetic diversity and BVDV virus. *Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.* 15(3):155-165.
- Dubovi E.J. 1994. Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10(3):503-14.
- Duffel S.J. & Harkness J.W. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117:240-245.
- Edmondson M.A., Givens M.D., Walz P.H., Gard J.A., Stringfellow D.A., Carson R.L. 2007. Comparison of test detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(4):376-81.
- Edwards S., Drew T.W. & Bushnell S.E. 1987. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia. *Vet. Rec.* 120:71.
- Edwards S.1991. Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently infected seropositive survivors. *Arch. Virol.* 3(suppl):125-132.

- Edwards S. & Paton D. 1995. Antigenic differences among pestiviruses. *Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice*.11:563-577.
- Ellis J.A. 1988. Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alteration in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Pathol.* 25:231-236.
- Ellis J.A. 1995. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:433-436.
- Flores E.F., Gil L.H.V., Botton S.A., Weiblen R., Ridpath J.L., Kreutz L.C., Pilati C., Driemeier D., Moojen V. & Wendelstein A.C. 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.* 77:175-183.
- Flores E.F., Ridpath J., Vogel F.S.F., Weiblen R. & Gil L.H.V.G. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87:51-60.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehle P. M., Alfieri A. A. & Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25(3):125-134.
- Flores E.F. & Schuch L.F.D. 2007. Diarréia viral bovina. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A., Borges J.R.J.(ed) *Doença de Ruminantes e Eqüídeos*. Pallotti. Santa Maria. 3 ed. 1: 81-93.
- Franki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. & Brown F. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. (Suppl.2)*:223-233.
- Fray M.D., Mann G.E., Clarke M.C. & Charleston B. 2000. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in cow. *Vet. Microbiol.*77:185-194.

- Fredriksen B., Sandvik T., Loken T. & Odegaard S.A. 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144(5):111-114.
- Frey H.R., Röder B., Depner K. & Liess B. 1995. Epidemiologische Charakterisierung eines Pestivirus-Isolates von einem virämischen Schwein in einem gemischten Schweine-Rinderbestand. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 102:181-183.
- Frey H.-R., Flebbe U. & Liess B. 1996. Prävalenz und klinische Symptomatik persistenter BVD-virusinfektionen in Rinderbeständen. Niedersachsens. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77:49-52.
- Fulton R.W., Confer A.W. & Burge L. 1995. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. *Vaccine.*13(8):725-733.
- Fulton R.W. & Burge L.J. 2000. Bovine viral diarrhoea types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. *Vaccine.*19:264-274.
- Givens M. D., Stringfellow D. A., Riddell K. P., Galik P.K., Carson R. L., Riddell M. G., et al. 2003. Pregnancies established after treatment of IVF bovine embryos with an antiviral agent. *Theriogenology.* 59:382.
- Grooms D.L., Brock K.V., Ward L.A. 1988. Detection of bovine diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infested with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:125-129.
- Grooms D.L. 1999. Role of bovine viral diarrhoea virus in the bovine respiratory disease complex. *Bovine Practitioner.* 32(2)7-12.
- Grooms D.L. & Keilen E.D. 2002. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(4):898-900.

- Grooms D.L., Baker J.C. & Ames T.R. 2002. Diseases caused by bovine virus diarrhoea virus, p.707-714 In: Smith B.P. (ed.), Large Animal Internal Medicine: diseases of horses, cattle, sheep, and goats. 3rd ed. Mosby, St. Louis, MO.
- Grooms D.L. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* March. 20(1):5-19.
- Gunn, H.M. 1993. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132:584-585.
- Hamers C., Di Valentin E., Lecomte C., Lambot M., Joris E., et al. 2002. Virus neutralizing antibodies against 22 bovine isolates in vaccinated calves. *Vet. J.* 163:61-7.
- Harkness, J.W., Sands, J.J., Richards & M.S. 1978. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res. Vet. Sci.* 24:98-103.
- Harkness, J.W. 1987. The control of bovine viral diarrhoea virus infection. *Ann. Rech. Vet.* 18:167-74.
- Hilbe M., Stalder H., Peterhans E., Haessig M., Nussbaumer M., Egli C., Schelp C., Zlinszky K., Ehrensperger F. 2007. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(1):28-34.
- Howard C., Brownlie J. & Clarke M. 1987. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.* 13:36-9.
- Houe H. & Meyling A. 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence or infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Med.* 11:9-16.

- Houe H. 1992. Age distribution of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus in twenty-two Danish dairy herds. *Can. J. Vet. Res.* 56:94-98.
- Houe H. & Palfi. V. 1993 Estimation of herd incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in herds previously without animals persistently infected with BVDV. *Acta. Vet. Scand.* 34:133-137.
- Houe H., Baker J.C., Maes R.K., Lloyd J.W. & Enevoldsen C. 1995. Comparison of the prevalence and incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in Denmark and Michigan and association with possible risk factors. *Acta Vet. Scand.* 36:521-531.
- Houe H., Baker J.C., Maes R. K., Wuryastuti H., Wasito R., Ruegg P.L. & Lloyd J.W. 1997. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea 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. *J. Vet. Diag. Invest.* 7:321-326.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64:89-106.
- Kafi M., McGowan M.R., Kirkland P.D. & Jillella D. 1997. The effect of bovine pestivirus infection on the superovulatory response of Friesian heifers. *Theriogenology.* 48:985-996.
- Kelling C.L., Steffen D. J., Topliff C. L., Eskridge K. M., Donis R. O. & Higichi D. S. 2002. Comparative virulence of isolates of bovine viral diarrhoea virus type II in experimentally inoculated six to nine-month-old calves. *Am.J. Vet. Res.* 63:1379-84.
- Kirkland P.D., Richards S.G., Rothwell J.T. & Stanley D.F. 1991. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 128:587-590.

- Kirkland P.D., McGowan M.R., Mackintosh S.G. & Moyle A. 1997. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.*140:124-127.
- Laamanen U.I. & Veijalainen. 1997. Sequence comparison of Finnish bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. In: Edwards S., Paton D.J. & Wensvoort G. (Eds.), *Proc. 3rd ESVV Symp. Pestivirus Infections, Lelystad The Netherlands.* 86-89:19-20.
- Lang-Ree J.R., Vatn T., Kommisrud E. & Loken T. 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet. Rec.* 135:412-413.
- Lemos R.A.A., Barros C.S.L., Salles M.S., Barros S.S., Peixoto P.V. 1993. Intoxicação espontânea por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 13:25-34.
- Lertora J., Paredes E., Reinhardt G. & Alberdi A. 2003. Inmunohistoquímica en biopsias de piel tratadas con proteína K y microondas para el diagnóstico en animales persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. *Arch. Med. Vet.* 35(1):23-36.
- Lertora J., Paredes E., Reinhardt G. & Alberdi A. 2003. Inmunohistoquímica em biopsias de piel tratadas con proteína K y microondas para el diagnóstico em animales persistentemente infectados con el virus diarrhoea viral bovina. *Arch. Med. Vet.*35(1)[np].
- Liebler-Tenorio E.M., Greiser-Wilke I. & Pohlenz J.F. 1997. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch. Virol.* 142(8):1613-1634.
- Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J. F. & Neil J. D. 2003. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(3):221-32.

- Lima M.L., Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F. & Arenhart S. 2004. Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. *Pesq. Vet. Bras.* 24:35-42.
- Loken T., Krogsrud J. & Larsen I.L. 1991a. Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, shepp and pigs. *Acta Vet. Scand.* 32:27-34.
- Loken T., Krogsrud J. & Bjerkas. 1991b. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Path.* 104:195-209.
- Loken, T. 1995. Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11:597-614.
- Loneragan G. H., Thomson D. U., Montgomery D. L., Mason G. L. & Larson R. L. 2005. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhea virus in feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226(4):595-601.
- Markhan R.J.F. & Ramnaraine M.L. 1985. Release of immunosuppressive substances from tissue culture cells infected with bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46:879-881.
- Martin S.W. & Bohac J.E. 1986. The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine virus diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in Ontario feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.* 50:351-8.
- McClurkin A.W., Coria M.F. & Cutlip R.C. 1979. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine vira diarrhea virus. *J. Am. Med. Assoc.* 174:1116-9.

- Meyling A. & Jensen A.M. 1988. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.* 17:97-105.
- Meyling A., Houe H. & Jensen A.M. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. sci. tech. Off. in. Epiz.* 9:75-93.
- Meyers G., Tautz N. & Stark R. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology.* 191:368-376.
- Meyers G., Tautz N., Becher P., Thiel H.J., Kümmerer & B.M. 1996. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea from cDNA constructs. *J. Virol.* 70:8606-8613.
- Moerman A., Straver P.J., Dejong M.C.M., Quak J., Baanvinger T. & Van Oirschot J.T. 1993. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet. Rec.* 132:622-626.
- Niskanen R., Alenius S., Larsson B. & Jacobsson S.O. 1991. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch. Virol. Suppl.* 3:245-251.
- Niskanen R. 1993. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.* 133:341-344.
- Niskanen R., Emanuelson U., Sundberg J., Larsson B. & Alenius S. 1995. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. *Prev. Vet. Med.* 23:229-237.
- Niskanen R., Lindberg A., Larsson B. & Alenius A., 1996. Primarily BVDV-infected calves as transmitters of the infection. *British Cat. Vet. Assoc. Ed.* 593-595.

- Njaa B. L., Clark E. G., Janzen E., Ellis J. A. & Haines D. M. 2000. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:393-9.
- Odeon A.C., Risatti G., Kaiser G.G., Leunda M.R., Odriozola E., Campero C.M. & Donis R.O. 2003. Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet. Microbiol.* Oct 17. 96(2):133-44.
- Ohmann H.B. 1983. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res. Vet. Sci.* 34(1): 5-10.
- Oliveira L.G., Oliveira E.A.S., Silva L.H.T. & Roeh P.M. 1996. Presença de pestivírus e anticorpos contra pestivírus em soros e cultivos celulares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48:513-521.
- Oliveira V.A. 2003. Comunicação pessoal (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Campo Grande. E-mail: valdemiralves@nin.ufms.br).
- Paisley L.G., Wells S. & Schmitt B.J. 1996. Prevalence of bovine viral diarrhoea antibodies in 256 US cow-calf operations: a survey. *Theriogenology.* 46:1313-1326.
- Paton D.J., Goodey R., Brockman S., Wood L. 1989. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet. Rec.* 124:63-64.
- Paton D.J., Carlsson U., Lowings J.P., Sands J.J., Vilcêk S. & Alenius S. 1995. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* 43:283-294.

- Pellerin C., Van Den Hurk J. & Lecomte J. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*. 203:260-267.
- Peréz M.J., Wilks C.R. & Rice M. 1994. Antibodies to bovine viral diarrhoea virus in beef cattle. *New Zealand Vet. J.* 42-43.
- Pituco E. M., Del Fava C. & Okuda L. H. 1997. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia bovina a vírus (BDV) em búfalos (*bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. *Arqs. Inst. Biol.. São Paulo*. 64(1):23-28.
- Potgieter L.N.D. 2004. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: *Infectious Diseases of Livestock*. 2 ed. V.2. Oxford University Press Southern África, Cape Town. 946-69. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11(3):501- 20.
- Radostits O.M., Gay C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2002. Diarréia viral bovina, doença das mucosas, complexo doença pestivirus bovino, p.974-993. In: Radostis O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W.(ed.), *Clínica Veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9^a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Reinhardt G., Riedmann S., Ernst S., Aguilar M., Enriquez R. & Gallardo J. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea/mucosal disease in southern Chile. *Prev. Vet. Med.* 10:73-78.
- Rebhun W.C., French T.W., Perdrizet J.A., Dubovi E.J., Dill S.G. & Karcher L.F. 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J. Vet. Inter. Med.* 3:42-46.
- Ridpath J.F., Bolin S.R. & Dubovi E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*. 205:66-74.

- Ridpath J.F. & Bolin S.R. 1995. Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*. 212:259-262.
- Ridpath J.F. & Bolin S.R. 1998. Differentiation of types 1 a, 1 b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cell. Probes*. 12(2):101-6.
- Roehe P.M., Oliveira E.A.S., Oliveira L.G. & Muñoz J.C.P. 1998. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no País. Anais do simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e vírus da diarréia Viral Bovina (BVDV). Santa Maria. RS. Laboratório de Virologia. UFSM. 30-48.
- Roth J.A., Kaekerle M.L. & Griffith R.W. 1981. Effects of bovine viral diarrhoea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am. J. Vet. Res.* 42:244-250.
- Saliki J.T. 1997. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle serum. *J. Clin. Microbiol.* 35:803-807.
- Saliki J.T. & Dubovi E.J. 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 20:69-83.
- Schaller P., Rüfenacht J., Strasser M. & Peterhans E. 1996. Management factors influencing the epidemiology of BVDV in Switzerland In: 3 rd ESVV Symp. Pestivirus Infections (Abstracts) Lelystad, The Netherlands. 129:19-20.
- Schild A.L., Riet-Correa F., Fernandes C.G., Damé M.C., Graça D.L. 2001. Hipoplasia cerebelar e porencefalia em bovinos Charolês no sul do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*. Santa Maria. 31(1):149-153.
- Schimitz M. 2006. Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina. UFRG - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

- Smith A. K. & Grimmer S.P. 2000. Birth of a BVDV – free calf from a persistently infected embryo transfer donor. *Vet. Rec.* 146(2):49-50.
- Steven R.B. & Grooms D.L. 2004. Origination and Consequences of Bovine Viral Diarrhea Virus diversity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* March, 20(1):51-68.
- Stokstar M., Niskanen R., Lindberg A., Thorén P., Belák S., Alenius S. & Loken T. 2003. Experimental infection of cows with bovine viral diarrhoea virus in early pregnancy – findings in serum and foetal fluids. *J. Vet. Med. B.* 50:424.
- Stroffregen B., Bolin S.R., Ridpath J.F. & Pohlenz J. 2000. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet. Microbiol.* 77:157-162.
- Tarry D.W., Bernal L. & Edwards S. 1991 Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet. Rec.* 128:82-84.
- Taylor L.F., Van Donkergoed J., Dubovi E.J., Harland R.J., Van Der Hurk J.V., Ribble C.S. & Janzen E.D. 1995. The prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in a population of feedlot calves in western Canada. *Can. J. Vet. Res.* 59:87-93.
- Taylor L.F., Janzen E.D. & Van Donkersgoed J. 1997. Losses over a 2-year period associated with fetal infection with the bovine viral diarrhoea virus in a beef cow-calf herd in Saskatchewan. *Can. Vet. J.* 38:23-28.
- Terpstra C. & Wensvoort G. 1988. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.* 45:137-142.
- Travén M., Alenius S., Fossum C. & Larson B. 1991. Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *J. Vet. Med. B.* 38:453-462.

- Tremblay R., Carman S., Stevenson D., Lusi P., Caldwell D. & Shapiro J. 1996. Acute BVD in Ontario. In: *Int. Symp. Bovine Viral Diarrhoea Virus. A 50 year review.* Cornell University. College of Veterinary Medicine. 65-70. June 23-25.
- Van Oirschot J.T., Brusckhe C.J.M. & Van Rijn P.A. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 64:169-183.
- Vega S., Bayón M.C., Jimenez T., Asensio A., Mirat F., Cid D. & De La Fuente R., 1997. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus in the cattle population of Cominidad de Madri (Spain). In: Edwards, S., Paton, D. J., Wensvoort G. (Eds.), *Proc. 3rd ESVV Symp Pestivirus Infections.* Lelystad. The Netherlands. 116-119:19-20.
- Vogel F.S.F., Scherer C.F.C., Flores E.F., Weiblen R., Lima M. E. & Kunrath C.F. 2001. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhas vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). *Ciência Rural.* Santa Maria. 31(5):831-838.
- Vogel F.S.F., Flores E.F., Weiblen R., Meyer S.V., Quadros V.L. & Oldoni I. 2002. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina. *Ciência Rural.* Santa Maria. 32(1):83-89.
- Voges H., 1997. A non-viraemic AI bull persistently shedding BVDV in his semen – a previously unidentified source of infection. In: *European Symposium on Control of BVD-virus Infection in Cattle (Abstracts).* Lillehammer. Norway. 45:3-5.
- Waage S., Krogsrud J., Nyberg O. & Sandvik T. 1997. Results achieved by a national programme for the eradication of bovine virus diarrhoea. In: Edwards S., Paton D.J., Wensvoort G. (Eds.), *Proc. 3rd ESVV Symp. Pestivirus Infections.* Lelystad. The Netherlands. 19-20 September 1996. 170-172.
- Walz P.H., Bell T.G., Grooms D.L., Kaiser L. Maes R.K., Baker J.C. 2001. Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally

infected with type I or type II bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Vet. Res.* Oct. 65(4):241- 247.

Wentink G.H., Aart T., Mirck M.H. & Van Exsel A.C.A. 1991a. Calf from a persistently infected heifer born after embryo transfer with normal immunity to BVDV. *Vet. Rec.* 129:449-450.

Wentink G.H., Van Exsel A.C.A., Goey I. & Lieshout Van J.A.H. 1991b. Spread of bovine virus diarrhoea virus in a herd of heifer calves. *Vet. Quart.* 13:233-236.

Werdin R., Amnes T., Goyal S. & DeVries G. 1989. Diagnostic investigation of bovine viral diarrhoea infection in a Minnesota dairy herd. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1:57-61.

Wilhelmsen C.L., Bolin S.R., Ridpath J.F., Cheville N.F. & Kluge J.P. 1991. Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 52:267-269.

Wittum T.E., Grotelueschen D.M., Brock K.M., Kvasnicka W.G., Floyd J.G., Kelling C.L. & Odde K.G. 2001. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Prev. Vet. Med.* 49:83-94.

Wolfmeyer A., Wolf G. & Beer M. 1997. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142:2049-2057.

ARTIGO

Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos em Mato Grosso do Sul.

Luiz C.L. Ferreira¹, Eduardo F. Flores², David Driemeier³, Orivaldo Melo⁴, e Ricardo A.A. Lemos^{5*}

RESUMO – São descritos os aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e laboratoriais de uma forma de dermatite associada à doença das mucosas (DM) em bovinos. Também são abordadas metodologias para a identificação de animais persistentemente infectados (PI) e o impacto nos índices zootécnicos no rebanho afetado. Os casos de dermatite associados com DM ocorreram em dois bovinos nelores de 12 a 24 meses, pertencentes a uma fazenda de ciclo completo de bovinos de corte no Estado de Mato Grosso do Sul. Os sinais clínicos nesses animais consistiam de emagrecimento lento e progressivo, formação de crostas difusas na pele de todo o corpo, pele ressecada, múltiplas ulcerações nas gengivas e face dorsal da língua, que evoluíram para fendas longitudinais, formação de projeções cornificadas e desprendimento dos cascos. Em um caso também ocorreu diarreia no estágio final da doença. Na necropsia observaram-se ainda erosões longitudinais no esôfago. O exame histológico revelou focos de necrose de coagulação na mucosa do esôfago e língua, com infiltrado de neutrófilos e linfócitos. As lesões da pele consistiam de necrose de coagulação da epiderme associada com infiltrado de neutrófilos e hiperqueratose. Nos dois casos, a suspeita clínica foi confirmada pelo isolamento e identificação dos biótipos citopático e não-citopático do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e pela detecção de antígenos virais em tecidos por imunistoquímica. De um lote de 300 bovinos que tiveram contato com animais afetados, 38 foram testados e apresentaram sorologia

¹ Recebido em .

Aceito para publicação em .

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal.

¹ Médico-Veterinário autônomo. Campo Grande-MS, 79041-231. E-mail: caio@ciapecuaria.com.br

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCR, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria-RS, Brasil. E-mail: flores@ccr.ufsm.br

³ Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9.090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS 91500-000. E-mail: davetpat@ufrgs.br

⁴ Médico-Veterinário autônomo, R. Túlio Abrão, 83, Campo Grande, MS 79051610.

⁵ Departamento de Medicina Veterinária da FMVZ, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. * Autor para correspondência. E-mail: eqrural@nin.ufms.br

positiva para BVDV. Amostras de sangue coletadas de 1.065 animais jovens da propriedade foram submetidas à pesquisa de vírus para identificar possíveis animais persistentemente infectados (PI). O vírus foi isolado do sangue de três bezerros no teste inicial e, 12 meses depois, em dois deles, que permaneceram na propriedade. Imunoistoquímica realizada em biópsia de orelhas identificou apenas um desses animais como positivo. O rebanho apresentou redução no índice de fertilidade e taxa de desmame no ano seguinte ao nascimento dos bezerros PI, mas esses indicadores retornaram posteriormente aos valores anteriores. Os dados obtidos comprovam a presença da infecção por BVDV em rebanhos no Estado de Mato Grosso do Sul e evidenciam a necessidade da inclusão dessa enfermidade no diagnóstico diferencial de causas de dermatites generalizadas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vírus da diarreia viral bovina, doença das mucosas, doenças de bovinos, doenças virais, dermatite.

Mucosal disease associated with generalized dermatitis in cattle in Mato Grosso do Sul, Brazil.

ABSTRACT – This paper reports epidemiological, clinical, pathological, and laboratory aspects of a form of dermatitis associated with mucosal disease in cattle. It also focuses on methods for identifying persistently infected animals and on the impact of the disease on fertility and weaning rates in affected herds. Cases of dermatitis associated with mucosal disease were found in two Nelore animals aged 12 to 24 months pertaining to a meat-cattle farm that operates the full cycle of production (calving, rearing, finishing) in Mato Grosso do Sul, southwestern Brazil. The clinical signs exhibited by affected animals included slow, progressive weight loss; formation of diffuse skin crusts in multiple body areas; skin dryness; multiple ulcerations on the gums and dorsal surface of the tongue, evolving to longitudinal fissures; formation of keratinized projections; and detachment of hoof horn. In addition, diarrhea affected one animal in the late stage of the disease. Necropsies revealed longitudinal erosion in the esophagus. Histological examination showed coagulation necrosis foci in esophageal and lingual mucosae, with neutrophil and lymphocyte infiltration. Skin lesions consisted of epidermal coagulation necrosis associated with neutrophil infiltration and hyperkeratosis. In both cases, clinical suspicion was confirmed by the isolation and identification of cytopathic and noncytopathic biotypes of the bovine viral diarrhea

virus (BVDV) and by immunohistochemical detection of viral antigens in tissues. Of 300 cattle that had contact with affected animals, 38 were found to be BVDV-positive by serology. Blood samples from 1065 young animals from the farm were examined for the presence of BVDV to identify potential persistently infected animals. The virus was isolated from blood of three calves in the initial test and, 12 months later, from two of them, which still remained on the farm. Only one of these was found to be BVDV-positive by immunohistochemical testing performed on ear-tissue samples. In the year following the birth of persistently infected calves, the herd underwent decreases in fertility and weaning rates, which later recovered their previous levels. The resulting data demonstrate the presence of infection with BVDV in herds in Mato Grosso do Sul and provide evidence in favor of including the disease in the differential diagnosis of causes of generalized dermatitis in cattle.

INDEXING TERMS: bovine viral diarrhea virus, mucosal disease, cattle diseases, viral diseases, dermatitis.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) é envelopado pequeno, da família Flaviridae, gênero *Pestivirus*, amplamente distribuído entre a população bovina mundial. A prevalência de anticorpos pode atingir 70% a 80% dos bovinos e até 80% dos rebanhos na América do Norte e em alguns países europeus. No Brasil, estudos sorológicos, descrições clínico-patológicas, isolamento e caracterização do agente têm sido realizados em várias regiões (Flores et al. 2005).

O BVDV apresenta dois biótipos reconhecidos com base no efeito causado por sua replicação em cultivo celular: citopático (CP) e não-citopático (NCP) (Steven & Grooms 2004). Os vírus NCP constituem a maioria dos isolados de campo e estão associados a diversas manifestações clínicas da infecção, inclusive a geração de bezerros persistentemente infectados (PI), cujo evento ocorre após a infecção fetal entre os 40 e 120 dias de gestação (Grooms 2004). Por outro lado, os vírus CP estão presentes, quase que exclusivamente, em casos da doença das mucosas (DM). Tem sido demonstrado que os vírus CP se originam dos vírus NCP nos animais PI, por meio de mutações ou recombinações no genoma (Meyers et al. 1992, 1996).

O BVDV também se apresenta em dois genótipos, BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 (Ridpath et al. 1994, Pellerin et al. 1994, Wolfmeyer et al. 1997), conforme propriedades antigênicas e análise filogenética (Ridpath et al. 1994).

A infecção pelo BVDV pode manifestar-se sob várias apresentações clínicas, que vão desde condições subclínicas até a morte do animal. Estima-se que 70% a 90% das infecções pelo BVDV ocorram sem manifestações clínicas. Outras formas da enfermidade incluem doença respiratória, gastrentérica, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, abortos, infertilidade temporária, defeitos congênitos, imunossupressão e doença das mucosas (Grooms et al. 2002).

Vacas prenhes infectadas com cepas NCP do BVDV antes do desenvolvimento da imunocompetência fetal (40 a 120 dias de gestação) podem parir bezerros que são imunotolerantes e persistentemente infectados pelo BVDV (Grooms 2004). Bovinos que nascem PI são importantes na epidemiologia, pois constituem a maior fonte de vírus nos rebanhos. Portanto, a sua detecção e remoção para o controle e/ou erradicação da infecção é fundamental (Dubovi 1992, Grooms 2004). A doença das mucosas (DM) ocorre quando os bezerros PI são superinfectados com o biótipo CP homólogos antigenicamente ao vírus NCP residente (Grooms & Keilen 2002, Radostits et al. 2002, Potgieter 2004). Isto ocorre provavelmente por meio de mutações ou recombinações no genoma do vírus NCP, originando o correspondente CP (Meyers et al. 1992, 1996).

A ocorrência de dermatite é comum na forma crônica da DM e se caracteriza, na maioria das vezes, por áreas de alopecia e hiperqueratose ou eczema na região cervical e erosões crônicas no períneo, vulva, prepúcio, junção entre a pele e o corno, espaço interdigital, na sola do casco e ao redor das pinças e dedos acessórios (Potgieter 2004). Entretanto, na literatura consultada não foram encontrados relatos de casos de DM associados à dermatite generalizada. Embora no Brasil existam diversos relatos da infecção por BVDV e de casos clínicos compatíveis com ela, apenas um caso de DM foi descrito recentemente (Schmitz 2006).

O objetivo deste trabalho foi descrever a epidemiologia, sinais clínicos, patologia e diagnósticos laboratoriais de dois casos de DM associados à dermatite generalizada severa, em um rebanho de bovinos de corte criados extensivamente no Estado de Mato Grosso do Sul (MS). Também foram abordados as metodologias utilizadas para a identificação de bovinos PI e o impacto causado pela doença nos índices zootécnicos nesse rebanho.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em uma propriedade de criação extensiva de bovinos de corte predominantemente da raça Nelore, com área de 3.100 hectares, localizada no município de Sidrolândia, MS. Nessa propriedade, dois bovinos (identificados como Bov. 1 e Bov. 2) apresentaram sinais clínicos e lesões compatíveis com DM. Eles foram encaminhados ao setor de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FMEZ/UFMS) e acompanhados durante a evolução clínica da doença até o estágio terminal, quando se realizou a necropsia e se colheram os materiais para o diagnóstico laboratorial. Após a confirmação do diagnóstico, foi realizado um inquérito epidemiológico retrospectivo e prospectivo para avaliar os efeitos da presença dos bovinos PI na produtividade. A composição média do rebanho é de 1.100 fêmeas com mais de 36 meses, 400 fêmeas de 24 a 36 meses, 400 fêmeas de 12 a 24 meses, 950 fêmeas até 12 meses, 40 machos com mais de 36 meses (touro), 300 machos de 12 a 24 meses e 850 machos até 12 meses. Os dados epidemiológicos e informações adicionais referentes ao índice de fertilidade e taxa de desmama da propriedade, nos últimos anos, foram obtidos com o proprietário, o médico-veterinário e o administrador da fazenda.

Fragmentos de diferentes órgãos e tecidos, incluindo a orelha, pele, cérebro, língua, esôfago, pulmão, coração, baço, linfonodos mesentéricos, íleo, fígado e rins, foram colhidos durante a necropsia e fixados em formol a 10% tamponado por 48 horas, incluídos em parafina, processados histologicamente e corados pela hematoxilina-eosina (HE). Parte desse material, já emblocado, foi processado para imunohistoquímica (IHQ) no setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A IHQ foi baseada na técnica descrita por Haines et al. (1992), utilizando um *kit* comercial (DAKO, USA) contendo um anticorpo secundário e um complexo de avidina conjugada com peroxidase, além do anticorpo monoclonal comercial anti-BVDV 15C5 (Syracuse, USA), que foi diluído em solução-tampão fosfato na concentração de 1:500.

Amostras de sangue total foram coletadas dos animais durante a fase de manifestação dos sinais clínicos, e encaminhadas para isolamento viral no Setor de Virologia da Universidade de Santa Maria (SV/UFMS). Esse isolamento foi realizado pela inoculação das capas flogísticas em células de cultivo (células de linhagem de rim fetal bovino – MDBK), livres de pestivírus. A replicação do vírus nas células inoculadas foi evidenciada pela detecção de proteínas virais por imunofluorescência indireta (IFA),

utilizando um *pool* de anticorpos monoclonais anti-BVDV (Botton et al. 1998 a) como anticorpo primário e um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína como anticorpo secundário (Sigma, Saint Louis, MO). Após o diagnóstico virológico (isolamento positivo) da enfermidade no Bov. 1, coletou-se aleatoriamente sangue de 38 bovinos que tiveram contato com esse animal, para a realização de testes sorológicos. Essas amostras foram submetidas à prova de soroneutralização (titulação) para BVDV no SV/UFSM. O teste de soroneutralização foi realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando diluições crescentes de soro contra doses constantes de vírus e células MDBK. A leitura dos testes foi realizada após 96 horas de incubação, pelo monitoramento do efeito citopático ou por imunofluorescência indireta (Botton et al. 1998b).

Para a identificação de possíveis bezerros PI, nascidos após os casos clínicos da DM, foram colhidas amostras de sangue de todos os bezerros nascidos no ano de 2005 e de todos os touros da propriedade. Estes, mais 212 vacas prenhes que chegaram à propriedade em 2003, haviam sido os únicos bovinos introduzidos no rebanho durante os anos de estudo. As amostras colhidas foram encaminhadas para o Setor de Doenças Infecciosas da FAMEZ/UFMS, onde foram processadas para separação do soro. As amostras de soro foram encaminhadas resfriadas para o SV/UFSM, para a realização de pesquisa de vírus por isolamento. Elas foram submetidas ao isolamento e identificação viral, conforme já descrito para o sangue total dos animais com DM. Fragmentos da extremidade da orelha dos bezerros que foram positivos para o isolamento do BVDV foram colhidos 45 dias após a realização do isolamento. Esse material foi fixado em formol tamponado a 10% e encaminhado para Setor de Patologia Veterinária da UFRGS para realização da IHQ.

Os índices de fertilidade, para um período de estação de monta de quatro meses, e a taxa de desmame foram calculados utilizando as seguintes fórmulas (Zimmer, A.H. & Euclides Filho, K. 1997):

$$\text{Índice de fertilidade} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de fêmeas prenhes (60 dias pós-cobertura)}}{\text{n}^{\circ} \text{ de fêmeas colocadas em reprodução}} \times 100$$

$$\text{Taxa de desmame} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de bezerros desmamados}}{\text{n}^{\circ} \text{ de fêmeas colocadas em reprodução}} \times 100$$

As frequências populacionais de vacas cobertas, prenhes e de bezerros desmamados foram comparadas entre os anos agrícolas pelo teste do qui-quadrado (χ^2), para tabelas de contingência. As diferenças entre frequências, quando significativas, foram ajustadas pelo teste de Yates para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os casos de DM com dermatite generalizada severa ocorreram em dois bovinos nelores, um macho com idade de 24 meses (Bov.1) e uma fêmea com 12 meses (Bov.2), os quais estavam em lotes de aproximadamente 300 bovinos com idade entre 12 e 24 meses. O Bov. 1 adoeceu em junho e o Bov. 2 em novembro/2005. Os dois animais estavam em lotes diferentes e não tinham contato entre si. A propriedade realiza programa de vacinação contra febre aftosa, brucelose, clostridiose e botulismo. Vacina contra BVDV não era utilizada na propriedade até agosto de 2005, quando apenas um lote de bois, onde ocorreram casos de encefalite por herpesvírus tipo 5 (BoHV-5), foi imunizado com vacina multivalente que continha também antígenos do BVDV.

Nos dois bovinos acometidos pela DM, os sinais clínicos eram semelhantes e se caracterizavam por dermatite generalizada (Fig. 1), emagrecimento lento e progressivo e ulcerações recobertas por fibrina na face dorsal da língua e nas gengivas. Com a evolução do quadro clínico, as ulcerações assumiam a forma de fendas transversais (Fig. 2A) com profundidade de até 0,5 cm, estendendo-se por toda a superfície da língua. A dermatite era do tipo crostosa e afetava a pele ao redor do focinho (Fig. 1A), da face interna das orelhas, da base dos cornos (Fig. 1A), da banda coronária e do espaço interdigital (Fig. 3). Na face interna das orelhas, as crostas eram circulares, com tendência à coalescência. Na banda coronária, a pele estava espessada, sem elasticidade, com perda de pêlos e rachaduras. O Bov. 2 apresentava rachadura no perioplo com desprendimento do estojo córneo do casco (Fig. 3). Nos dois bovinos, as crostas ao redor do focinho, dos cornos e no espaço interdigital assumiam forma de papilas com aspecto e consistência semelhantes ao tecido córneo (Fig. 1A e 3). Nas demais regiões do corpo, a dermatite era do tipo exsudativa e se caracterizava pela formação de tufo de

pêlos por todo o corpo (Fig. 1B), sendo mais severa na região cervical, axilar e perineal. Exames laboratoriais não revelaram a presença de *Dermatophilus congolensis* e *Trichophyton* spp. A evolução do quadro clínico foi de 35 dias no Bov. 1 e de 45 dias no Bov. 2, o qual foi sacrificado no estágio terminal da doença.

Na necropsia, além das lesões observadas ao exame clínico, percebia-se que as lesões ulcerativas na cavidade oral estendiam até a base da língua (Fig. 2A), alcançavam a faringe e o esôfago. Neste órgão havia múltiplas ulcerações longitudinais em toda a extensão da mucosa (Fig. 2B).

O exame microscópico da pele do espaço interdigital, da banda coronária, do entorno do focinho e da junção do corno com a pele revelou principalmente hiperqueratose moderada a acentuada. Na epiderme havia focos extensos de necrose de coagulação que alcançavam o limite da derme, onde se observava infiltrado moderado de linfócitos, predominantemente ao redor dos vasos. Nos fragmentos de pele das regiões cervical, axilar e perineal, a dermatite era do tipo exsudativa e se caracterizava por necrose de coagulação dos estratos basal e espinhoso da epiderme associada a infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos, moderado a acentuado, e moderada paraqueratose. As lesões na língua consistiam de hiperqueratose e necrose de coagulação focalmente extensiva na epiderme. Na submucosa havia acentuado infiltrado inflamatório constituído predominantemente por linfócitos e alguns neutrófilos (Fig. 4). No esôfago havia focos de necrose de coagulação associados a infiltrado inflamatório, predominantemente constituído por neutrófilos, que atingia toda a mucosa, alcançando o limite com a submucosa.

Nos dois casos, o diagnóstico foi confirmado laboratorialmente pelo isolamento de BVDV citopático e não-citopático concomitantemente, a partir do sangue total; e pela identificação de antígenos virais na IHQ de fragmentos da extremidade da orelha, do esôfago e do cérebro.

Os 38 bovinos assintomáticos que tiveram contato com o Bov. 1, na fase clínica, revelaram-se positivos no teste de soroneutralização, com títulos variáveis (Quadro 1). Dos touros adquiridos (40) e bezerros nascidos (1.025) após o diagnóstico da BVDV no rebanho, o vírus foi isolado de três bezerros machos de 6 a 7 meses. Em dois desses bezerros, a IHQ, realizada 45 dias após a coleta do sangue para isolamento do vírus, inicialmente, apresentou resultado negativo. Em novo exame realizado, 12 meses após, um desses bezerros foi positivo na IHQ e os dois foram positivos no isolamento viral.

Os resultados do índice de fertilidade e da taxa de desmame desse rebanho estão demonstrados no Quadro 2.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de dermatite generalizada acentuada causada pela DM baseou-se no quadro clínico, nos achados de necropsia, nas lesões histológicas. Ele foi confirmado pelo isolamento viral dos biótipos CP e NCP e pela detecção de antígenos de BVDV na IHQ, que estão de acordo com os métodos de diagnóstico descritos na literatura (Grooms & Keilen 2002, Potgieter 2004, Flores et al. 2005, Schmitz 2006).

No presente relato, a dermatite exsudativa generalizada acentuada foi o principal sinal clínico observado, juntamente com as lesões ulcerativas na gengiva e língua. Embora a ocorrência de dermatite seja comum em casos crônicos de DM (Grooms et al. 2002, Potgieter 2004), e que BVDV seja frequentemente encontrado em biópsias de pele de bovinos PI (Braum et al. 1996), confirmando o tropismo do vírus pelo epitélio, não foram encontradas descrições sobre a ocorrência de dermatite generalizada e acentuada como a observada no presente relato. As lesões de pele, descritas em bovinos cronicamente afetados pela DM, são localizadas e manifestam-se geralmente como áreas de alopecia e hiperqueratose ou eczema na região cervical e erosões crônicas no períneo, vulva e prepúcio, na junção entre a pele e o corno, espaço interdigital, na sola do casco e ao redor das pinças e dedos acessórios (Potgieter 2004). Além das lesões de pele, são observados sinais clínicos semelhantes aos casos agudos de DM, porém menos acentuados, como diarreia contínua ou intermitente e secreção oculonasal. No presente relato, a diarreia foi observada somente no estágio terminal da doença no Bov. 2, e não ocorreu secreção oculonasal em qualquer dos bovinos estudados.

As lesões de pele e o curso clínico observados no presente estudo foram muito semelhantes aos descritos por Odeon et al. (2003), nos quais a dermatite foi a principal manifestação clínica e a morbidade foi de 4,1% a 10%. Ressalta-se que os casos descritos por esses autores não se tratavam de DM e não apresentavam lesões na cavidade oral e esôfago. Nos surtos descritos por Odeon et al. (2003), antígenos do BVDV foram encontrados em áreas de dermatite exsudativa indicando o tropismo do vírus por células epiteliais. A dermatite caracterizou-se por lesões crostosas ao redor do focinho, nas orelhas e pálpebras, e dermatite exsudativa generalizada mais acentuada nas axilas, períneo e virilha. O curso clínico foi de até 30 dias com letalidade variável,

sendo em alguns casos superior a 30%. Esses autores consideram que as ocorrências de lesões de pele, na ausência de lesões do sistema digestivo, não são as manifestações típicas da infecção aguda pelo BVDV nem da DM, sugerindo a existência de relação entre as lesões observadas e a virulência dos vírus isolados.

A evolução clínica de 35 (Bov. 1) a 45 dias (Bov. 2), observada nos dois bovinos desse surto, pode ser considerada como a forma crônica de DM, pois na forma aguda a morte geralmente ocorre entre 3 e 10 dias (Grooms et al, 2002), podendo chegar a 21 dias (Potgieter 2004). Na forma crônica, a evolução pode ser de até 18 meses (Potgieter 2004). A idade dos bovinos afetados também está de acordo com o que é descrito para a DM (Grooms et al. 2002, Potgieter 2004).

A dermatite apresentada pelos bovinos no presente estudo foi mais acentuada e generalizada, diferindo de outro caso de DM crônica diagnosticada no Estado de Mato Grosso do Sul em um bovino de 22 meses de idade (Flores et al. 2005). Salienta-se que este também não apresentou diarreia e as lesões erosivas nas mucosas do trato digestivo estavam restritas ao esôfago. Esse bovino apresentou emagrecimento progressivo, erosão do espelho nasal e discreta dermatite exsudativa na região cervical. A evolução foi de 30 dias e o bovino foi sacrificado em fase terminal da doença (Oliveira 2003).

Um caso de DM foi descrito recentemente no Brasil em um bovino que apresentou enterite fibrinonecrótica, edema de serosa e necrose das placas de Peyer no intestino delgado e fissuras na mucosa do cólon proximal, mas não foram observadas lesões de pele (Schmitz 2006). As lesões orais e na mucosa do esôfago, apresentadas pelos bovinos deste relato, eram semelhantes às descritas para um caso de enfermidade gastrointestinal respiratória causada por BVDV tipo 2 biótipo CP descrito no Rio Grande do Sul (Flores et al. 2000). Entretanto, no presente caso, as lesões de pele eram mais acentuadas e os demais sinais clínicos e achados de necropsia descritos por esses autores não estavam presentes. Outros relatos clínico-patológicos descrevem a ocorrência de enfermidade compatível com DM no Brasil (Flores & Schuch 2007), porém sem comprovação virológica e nenhum deles associado com dermatite generalizada.

Na necropsia dos dois bovinos deste relato, as lesões ulcerativas estavam restritas à cavidade oral e ao esôfago. Embora lesões graves em outras mucosas do trato digestivo, caracterizadas por erosões e ulcerações nos pilares do rúmen, omaso, abomaso, intestino (placas de Peyer necróticas, hemorrágicas) e ceco, são relatadas na DM (Grooms et al. 2002).

O isolamento do vírus do sangue total, dos dois bovinos, está de acordo com outros autores (Grooms et al. 2002, Radostits et al. 2002, Saliki & Dubovi 2004), que descrevem ser este o material de eleição para o diagnóstico por isolamento. A imunistoquímica também demonstrou ser um eficiente meio de diagnóstico, o que já havia sido observado (Grooms et al. 2002, Lertora 2003, Schmitz 2006).

A detecção da infecção, por soroneutralização, em todos os bovinos testados, os quais correspondiam a 10% do total do lote exposto ao Bov. 1, confirma relatos anteriores de que bovinos em contato com animais PI apresentam altas taxas de infecção. Essas taxas podem atingir, em sistemas fechados de criação, mais de 90% dos bovinos expostos antes que eles completem 3-4 meses de idade (Houe et al. 1993). Dados semelhantes foram observados por outros autores (Moerman et al. 1993) que descrevem a soroconversão, em um período de três meses, em todos os bovinos soronegativos que foram colocados em contato com animais PI.

Os títulos de anticorpos neutralizantes encontrados estiveram entre 5 e 320, diferindo do relato no qual, na infecção natural e experimental, os títulos de anticorpos neutralizantes contra o BVDV variaram de 256 a 4.096 e nunca foram menores que 64, inclusive três anos após a infecção (Frederiksen et al. 1999). Entretanto, é importante lembrar que diferentes cepas virais, células e protocolos podem ter sido utilizados na soroneutralização, dificultando as comparações (Flores et al. 2005).

O isolamento do vírus, em três amostras de soro colhidas dos bezerros nascidos no ano da ocorrência da doença das mucosas, mostra que essa metodologia pode ser utilizada para a identificação de bovinos PI. Entretanto, é necessário um novo teste após 3 a 4 semanas para concluir se o bovino é mesmo PI ou se trata de infecção aguda (Sandvik 1999). No presente caso, a confirmação não foi possível em um dos bovinos, pois o proprietário vendeu esse animal antes da realização de novo teste. Nos outros dois bezerros, a presença do vírus não foi confirmada pela IHQ realizada em biópsia de orelha, 45 dias após a realização do isolamento. Na nova coleta, 12 meses após, um bezerro foi positivo na IHQ e os dois foram novamente positivos no isolamento viral, evidenciando que os dois bezerros eram PI. Variações nos resultados são descritas entre laboratórios e entre métodos de diagnóstico (Edmondson et al. 2007, Hilbe et al. 2007). A reação de transcrição reversa da cadeia de polimerase (RT-PCR) também pode ser utilizada como método de diagnóstico para detecção de bovinos PI (Pilz et al. 2007).

Os índices de fertilidade e taxa de desmame encontrados na propriedade variaram, analisando-se anos anteriores e posteriores ao aparecimento dos casos de

doença das mucosas, ou seja, do contato de bovinos da propriedade com animais PI. Esses dados foram analisados estatisticamente e os resultados mostram que no ano agrícola 2005/2006, posterior ao aparecimento da doença das mucosas na propriedade, apesar das condições climáticas adversas (baixa precipitação), observou-se uma melhora significativa ($p < 0,05$) no índice de fertilidade e na taxa de desmame, mesmo sem a adoção de qualquer medida específica para o controle da BVDV. O manejo sanitário, reprodutivo e nutricional da propriedade não foi alterado. É possível que o retorno ao índice zootécnico se deva à imunidade natural adquirida pelos bovinos à infecção por BVDV.

Os dados obtidos neste relato comprovam a presença da infecção e de casos clínico-patológicos causados pelo BVDV em bovinos de corte criados extensivamente no Estado de Mato Grosso do Sul. Ressalta-se a ocorrência de dermatite generalizada observada nos dois casos, a qual não é uma manifestação clínica descrita na maioria dos casos de BVDV, evidenciando a necessidade da inclusão dessa enfermidade no diagnóstico diferencial de causas de dermatites generalizadas.

QUADROS E FIGURAS

Quadro 1. Resultado da soroneutralização para BVDV de 10% dos animais, escolhidos aleatoriamente, de um lote no qual ocorreu o caso do Bov. 1 de doença das mucosas, realizado no Setor de Virologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

Nº de animais	Título BVDV
10	160
8	80
7	20
6	40
3	10
2	320
2	5

Quadro2. Índice de fertilidade e taxa de desmame dos animais de uma propriedade de criação extensiva de bovinos de corte, com média de 4.000 cabeças, que realiza as atividades de cria, recria e engorda, localizada no município de Sidrolândia, Mato Grosso do Sul, na qual ocorreram dois casos de doença das mucosas.

Ano agrícola	Vacas		Desmamados	% ²
	cobertas/prenhas	% ¹		
2002/03	1.565/1.190	76 ^A	1.238	#
2003/04	1.787/1.323	74 ^A	1.218	68,1 ^B
2004/05*	1.615/1.087	67,3 ^B	1.003	62,1 ^B
2005/06	1.338/1.119	83,6 ^{AC}	1.033	77,2 ^{BC}
2006/07	1.446/1.191	82,4 ^{AC}	–	–

¹ $\chi^2 = 719,17$; GL = 4; $p < 0,0001$; ² $\chi^2 = 976,09$; GL = 4; $p < 0,0001$;

Letras distintas entre linhas representam diferença significativa ($p < 0,001$)

* estação de monta seguinte ao nascimento dos bezerros PI

como entraram no rebanho 212 vacas prenhes, não foi possível calcular corretamente a taxa de desmame.



Fig. 1. Bovino (Bov. 1) com sinais clínicos de doença das mucosas associada à dermatite. A) Dermatite na cabeça e formação de projeções cornificadas em forma de papilas na junção da pele com o corno e crostas no focinho; B) Dermatite na região inguinal e escrotal com crostas.

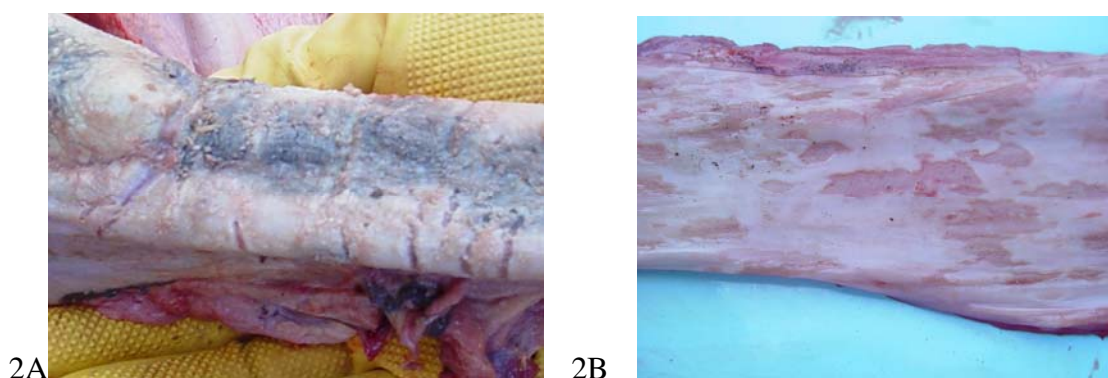


Fig.2. Achados de necropsia no trato digestivo em bovino (Bov. 1) com doença das mucosas associada à dermatite. A) Ulcerações que evoluíram para fendas longitudinais na língua; B) Numerosas ulcerações longitudinais no esôfago.



Fig.3. Bovino (Bov. 2) com sinais clínicos de doença das mucosas associada à dermatite. Formação de projeções cornificadas em forma de papilas no espaço interdigital, desprendimento dos cascos e crostas na pele.

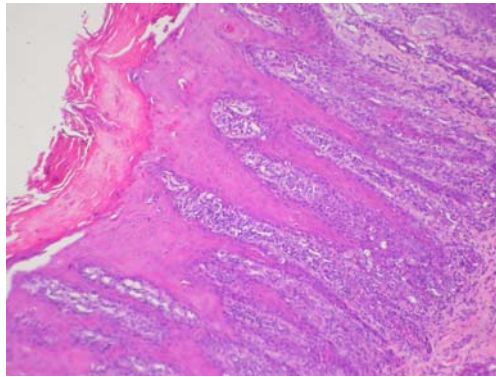


Fig.4. Histopatologia da língua de bovino com doença das mucosas associada à dermatite. Língua com hiperqueratose, áreas de ulceração e inflamação na submucosa. HE, obj. 10

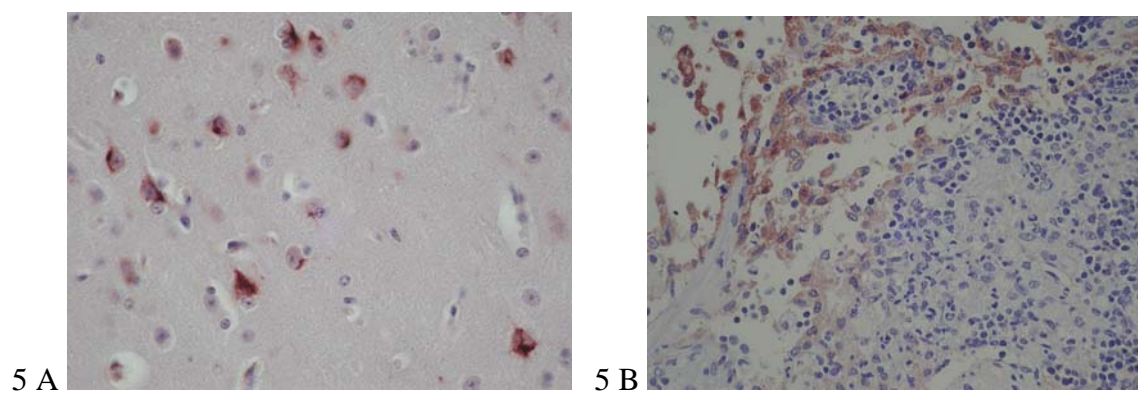


Fig.5. IHQ de bovino com doença das mucosas associada à dermatite. A) Neurônios do córtex cerebral com marcação positiva acentuada pela IHQ para o BVDV. Obj. 40. B) Macrófagos em seios subcapsulares marcados positivamente para o BVDV.obj. 40.

REFERÊNCIAS

- Botton S.A., Gil L.H.G., Silva A.M., et al. 1998a. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18:84-92.
- Botton S.A., Silva A.M., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 1998b. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine diarrhea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:1429-1438.
- Braum U., Thur B., Weiss M. & Giger T. 1996. Bovine virus diarrhea/mucosal disease in cattle-clinical findings in 103 calves and cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 138:465-475.
- Dubovi E.J. 1992. Genetic diversity and BVDV virus. *Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.* 15(3):155-165.
- Edmondson M.A., Givens M.D., Walz P.H., Gard J.A., Stringfellow D.A. & Carson R.L. 2007. Comparison of test detection of bovine viral diarrhea virus in diagnostic samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(4):376-81.
- Flores E.F., Gil L.H.V., Botton S.A., Weiblen R., Ridpath J.L., Kreutz L.C., Pilati C., Driemeier D., Moojen V. & Wendelsteina C. 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.* 77:175-183.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehle P. M., Alfieri A. A. & Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25(3):125-134.
- Flores E.F. & Schuch L.F.D. 2007. Diarreia Viral Bovina. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A., Borges J.R.J.(ed) *Doença de ruminantes e eqüídeos*. Pallotti. Santa Maria. 3 ed. 1: 81-93.

- Fredriksen B., Sandick T., Loken T. & Odegaard S.A. 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with Bovine Virus Diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144(5):111-114.
- Grooms D.L. & Keilen E.D. 2002. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin Diagn Lab Immunol.* Jul. 9(4):898-900.
- Grooms D.L., Baker J.C. & Ames T.R. 2002. Diseases Caused By Bovine Virus Diarrhoea Virus. *Large Animal Internal Medicine: diseases of horses, cattle, sheep, and goats* / [edited by] Bradford P. Smith. 3 rd ed.
- Grooms D.L. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* March. 20(1):5-19.
- Haines D.M., Clark E.J. & Dubovi E.J. 1992. Monoclonal antibody-based immunohistochemistry detection of bovine viral diarrhoea virus formalin-fixed, paraffinembedded tissues. *Vet. Pathol.* Jan. 29(1):27-32.
- Hilbe M., Stalder H., Peterhans E., Haessig M., Nussbaumer M., Egli C., Schelp C., Zlinszky K. & Ehrensperger F. 2007. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(1):28-34.
- Houe H., Pedersen K.M. & Meyling A. 1993. The effect of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection on conception rate. *Prev. Vet. Med.* 15:117-123.
- Lertora J., Paredes E., Reinhardt G. & Alberdi A. 2003. Inmunohistoquímica em biopsias de piel tratadas con proteína K y microondas para el diagnóstico em animales persistentemente infectados con el virus diarra viral bovina. *Arch. Med. Vet.* 35(1).

- Meyers G., Tautz N. & Stark R. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*. 191:368-376.
- Meyers G., Tautz N., Becher P., Thiel H.J. & Kümmerer B.M. 1996. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea from cDNA constructs. *J. Virol.* 70:8606-8613.
- Moerman A., Straver P.J., Dejong M.C.M., Quak J., Baanvinger T. & Van Oirschot J.T. 1993. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet. Rec.* 132:622-626.
- Odeon A.C., Risatti G., Kaiser G.G., Leunda M.R., Odriozola E., Campero C.M. & Donis R.O. 2003. Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet. Microbiol.* Oct 17, 96(2):133-44.
- Oliveira V.A. 2003. Comunicação pessoal (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Campo Grande. E-mail: valdemiralves@nin.ufms.br).
- Pellerin C., Van Den Hurk J. & Lecomte J. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*. 203:260-267.
- Pilz D., Alfieri A.F., Lunardi M. & Alfieri A.A. 2007. RT-PCR em pools de soros sanguíneos para diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarréia viral bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(1):1-7.
- Potgieter L.N.D. 2004. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: *Infectious Diseases of Livestock*. 2 ed. V.2. Oxford University Press Southern África, Cape Town. 946-69. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11(3):501- 20.
- Radostits O.M., Gay C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2002. Diarréia viral bovina, doença das mucosas, complexo doença pestivirus bovino. In: *Clínica veterinária: Um*

trato de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 974-93.

Ridpath J.F., Bolin S.R. & Dubovi E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*. 205:66-74.

Sandvick, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet, Microbiol.* 64:123-134.

Saliki J.T. & Dubovi E.J. 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 20:69-83.

Schimitz M. 2006. Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina. UFRG - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Steven R.B. & Grooms D.L. 2004. Origination and Consequences of Bovine Viral Diarrhoea Virus diversity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* March, 20(1):51-68.

Wolfmeyer A., Wolf G. & Beer M. 1997. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch, Virol.* 142:2049-2057.

Zimmer A.H. & Euclides Filho K. 1997. As pastagens e a pecuária de corte brasileira. In: Simpósio internacional sobre produção animal em pastejo. Viçosa. Anais... Viçosa:UFV. 349-379.