



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**FELIPE DA SILVA FARIA**

**DIARREIA VIRAL BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA E RELATO DE CASOS**

**Monografia apresentada para a conclusão do  
Curso de Medicina Veterinária da Faculdade  
de Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília**

**Brasília DF  
2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**FELIPE DA SILVA FARIA**

**DIARREIA VIRAL BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA E RELATO DE CASOS**

**Monografia apresentada para a conclusão do  
Curso de Medicina Veterinária da Faculdade  
de Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília**

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges**

**Brasília DF  
2013**

## **Ficha Catalográfica**

Faria, Felipe da Silva

DIARREIA VIRAL BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA E RELATO DE CASOS / Felipe da Silva Faria, orientação de José Renato Junqueira Borges – Brasília, 2013

67 páginas

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013

1. Palavras chave: Bovinos, diarreia viral bovina, sanidade animal.

## **Cessão de Direitos**

Nome do Autor: Felipe da Silva Faria

Título da Monografia de Conclusão de Curso: DIARREIA VIRAL BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA E RELATO DE CASOS.

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

(Assinatura)

Felipe da Silva Faria

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: FARIA, Felipe da Silva

Título: DIARREIA VIRAL BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA E RELATO DE CASOS.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de Universidade de Brasília

Aprovada em: 31 / 01 / 13

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: SS

Assinatura: 

Prof. Me. Fábio Henrique Bezerra Ximenes

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: SS

Assinatura: 

MV João Gabriel César Palermo

Instituição: EMATER – DF

Julgamento: SS

Assinatura: 

## **Agradecimentos**

Agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais, Edmar José Alves Faria e Rita de Cássia de Magalhães Silva Faria, por todo apoio e confiança a mim concedidos durante estes longos anos da graduação, sem os quais esta vitória não seria possível.

Aos colegas de curso e companheiros de república das duas universidades por onde passei, pela amizade e pelos momentos vividos juntos.

Ao meu gerente no Banco do Brasil, José Pereira da Silva Neto, pela compreensão e flexibilidade de horário concedida.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Lavras e da Universidade de Brasília, em especial aos professores e veterinários residentes do Hospital Escola de Grandes Animais da Granja do Torto, pelo conhecimento que foi compartilhado comigo.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária da UnB pelos materiais concedidos para este trabalho.

Ao meu orientador, José Renato Junqueira Borges, pelo grande apoio nesta fase de conclusão do curso.

## RESUMO

FARIA, F. S. Diarreia Viral Bovina: Revisão de Literatura e Relato de Casos. Bovine Viral Diarrhea: Literature Review and Cases Report. 2013. 67 p. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, DF.

A bovinocultura é um dos principais destaques da economia brasileira e tem grande importância socioeconômica para a população rural e urbana do país. A atividade sempre foi desafiada pelos problemas de sanidade, mas nos últimos anos, a grande competitividade e redução das margens de lucro do setor têm evidenciado os prejuízos causados pelas doenças infecciosas. A diarreia viral bovina é uma das doenças que mais causam prejuízos a toda cadeia produtiva, tanto de corte como de leite, por ser uma doença insidiosa, de difícil diagnóstico e controle, e que se manifesta de várias formas, sendo a forma reprodutiva a que causa mais prejuízos. Este trabalho teve o objetivo de fazer uma revisão de literatura abordando as diversas formas de manifestação da doença, os métodos de diagnóstico, controle e prevenção, com o intuito de ajudar os profissionais a lidarem com este problema. Os dois casos comprovados, atendidos pelo Hospital Escola de Grandes Animais da Universidade de Brasília, comprovam a circulação do vírus no Distrito Federal e entorno, reforçando a necessidade dos profissionais da região de se preocuparem com a doença.

Palavras chave: Bovinos. Diarreia viral bovina. Sanidade animal.

## **ABSTRACT**

FARIA, F.S. Bovine Viral Diarrhea: Literature Review and Cases Report. Diarreia Viral Bovina: Revisão de Literatura e Relatos de Casos. 2013. 67p. Monograph (Completion of the Course of Veterinary Medicine) – Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Cattle raising is one of the main highlights of the Brazilian economy and has great socio-economic importance to the rural and urban population of the country. The activity has always been challenged by health problems, but in recent years, the high competitive and the reduction of profit margins in the sector have shown the economic loss caused by infectious diseases. The bovine viral diarrhea is one of the diseases that cause the most economic losses to the production chain, beef and dairy, because it is an insidious disease, difficult to diagnose and control, and which manifests itself in various ways, the reproductive way being the one that cause more economic loss. This work aimed to make a review of the literature, addressing the various manifestations of the disease, the methods of diagnosis, control and prevention, in order to help professionals to deal with this problem. The two proven cases, handled by the Large Animal Teaching Hospital of the University of Brasilia, prove the circulation of the virus in Federal District and around, reinforcing the need of the professionals in the region being concerned about the disease.

Key words: Cattle. Bovine viral diarrhea. Animal health.

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	8
2	Revisão de Literatura.....	9
2.1	Etiologia.....	9
2.2	Epidemiologia.....	10
2.3	Patogenia e Sinais Clínicos.....	13
2.3.1	Infecção primária pós-natal.....	13
2.3.2	Infecção pré-natal (uterina).....	15
2.3.3	Doença das Mucosas.....	20
2.3.4	Imunossupressão.....	21
2.4	Diagnóstico.....	22
2.4.1	Métodos de diagnóstico.....	24
2.4.2	Aplicação laboratorial dos métodos de diagnóstico e interpretação dos resultados.....	28
2.5	Controle e Prevenção.....	32
3	Relato dos Casos.....	34
3.1	1º Caso.....	34
3.2	2º Caso.....	41
3.3	3º Caso.....	46
3.4	Discussão sobre os casos clínicos.....	51
4	Conclusão.....	53
5	Referências Bibliográficas.....	54



## 1 Introdução

A bovinocultura é um dos principais destaques da economia brasileira. Segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com mais de 200 milhões de cabeças e, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, sendo responsável por um quinto da carne comercializada internacionalmente, havendo a perspectiva de que até 2019 as exportações brasileiras de carne bovina representarão cerca de 60% do comércio mundial. Ainda segundo o MAPA, o valor bruto da produção das cadeias produtivas da carne e do leite é estimado em 67 bilhões de reais por ano, portanto, o prejuízo causado por uma doença como a Diarreia Viral Bovina, mesmo que represente uma porcentagem mínima, tem valor muito significativo (Brasil, 2013).

Os números demonstram a importância econômica e social que a bovinocultura exerce em nosso país, o que torna ainda maior a responsabilidade que os profissionais devem ter para zelar desta atividade. Pois quanto maior for a fatia de produção destinada ao comércio exterior, maior a nossa dependência às exigências dos mercados importadores, que quase sempre estão relacionadas à sanidade animal, à segurança alimentar e à sustentabilidade da produção. Como exemplo temos o recente caso de Encefalopatia Espongiforme Bovina atípica que ocorreu no estado do Paraná em 2010 e após sua confirmação em 2012 vários países impuseram embargo à carne brasileira, mesmo sem justificativa técnica para tal. Ainda não é o caso da Diarreia Viral Bovina, mas existe grande chance de que no futuro, alguns países que possam estar buscando a erradicação da doença, deixem de importar produtos bovinos como carne ou sêmen, de países que não exerçam um bom controle oficial sobre a doença. Atualmente ela é uma doença de notificação obrigatória.

Nos países que já são livres da Febre Aftosa, o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) é considerado o agente viral mais importante da bovinocultura e tem sido alvo de numerosos estudos e programas de controle e/ou erradicação durante décadas (Flores et al., 2005).

O presente trabalho teve o objetivo de trazer uma revisão de literatura atual sobre as diversas formas de infecção causadas nos bovinos pelo BVDV e relatar a presença do vírus no Distrito Federal, com casos atendidos pelo Hospital Escola de Grandes Animais da Universidade de Brasília.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Etiologia

O Vírus da Diarreia Viral Bovina (*Bovine Viral Diarrhea Virus* - BVDV) é membro do gênero *Pestivirus*, da família *Flaviviridae*. Atualmente três espécies de *Pestivirus* são reconhecidas: o BVDV, o Vírus da Doença da Fronteira dos ovinos (Border Disease) e o Vírus da Peste Suína Clássica. Essa proximidade filogenética permite a infecção cruzada entre as espécies, o que pode comprometer a acurácia dos métodos sorológicos de diagnóstico (Baker, 1995; Radostitis et al., 2007).

As partículas virais são esféricas e de aproximadamente 50 nm. de diâmetro, possuindo um capsídeo de forma icosaédrica e um envelope bem aderido, rico em lipídeos, o que o torna susceptível aos desinfetantes mais comuns (Murphy et al., 1999).

O genoma é composto por uma fita simples de RNA, com polaridade positiva, não segmentada, de aproximadamente 12.500 pares de bases. Ele é traduzido em uma única poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos, que posteriormente é clivada e dá origem a 10 ou 11 proteínas, sendo C, E<sup>ms</sup>, E1 e E2 proteínas estruturais e N<sup>pro</sup>, NS2-3 (ou NS2 e NS3), NS4A, NS4B, NS5A e NS5B proteínas não estruturais, que exercem funções no processo de replicação viral (Potgieter, 2004; Horzinek, 1991).

Uma característica marcante dos *Pestivirus* é a enorme variabilidade antigênica observada, principalmente nas glicoproteínas do envelope do BVDV. A Glicoproteína E2, em especial, possui uma região de hipervariabilidade que é responsável pelas altas frequências de mutações (taxa na ordem de 0,03 a 2% por nucleotídeo/ano) e recombinações genéticas observadas no vírus, sendo que dois grupos principais, antigenicamente distintos, foram identificados como BVDV-1 e BVDV-2, e podem ainda ser divididos em diversos subgrupos (Donis, 1995; Strauss et al., 1996 *apud* Goens, 2002). Os vírus do genótipo BVDV-1 são mais comuns e conhecidos há mais tempo, constituindo a maioria das cepas vacinais e estirpes de referência. O genótipo BVDV-2 só foi identificado na década de 1990, em surtos de BVD aguda severa e síndrome hemorrágica na América do Norte, sendo frequentemente associados a casos clínicos mais severos, entretanto hoje se sabe que a virulência e a patogenicidade do vírus independem de seu grupo genotípico (Fino et al., 2012; Flores et al., 2005).

Independentemente do genótipo o BVDV também é classificado em dois biótipos, de acordo com seu efeito durante a replicação em cultivos celulares. O vírus citopático (CP) provoca extensos danos nas células de cultivo, como vacuolização citoplasmática e destruição celular completa entre 48 e 72 horas. Eles são minoria nas amostras de campo e são isolados, quase que exclusivamente, de animais com a Doença das Mucosas ou surtos de doença pós-vacinal. O vírus não-citopático (NCP) causa pouca ou nenhuma mudança na morfologia celular, constituindo a maioria dos isolados de campo e associado a infecções naturais, enfermidades entéricas, reprodutivas e congênitas. Somente o biótipo NCP atravessa a barreira placentária, invade o feto e estabelece nele uma infecção persistente, criando o chamado animal persistentemente infectado (PI), que tem papel fundamental na disseminação do vírus no rebanho e posteriormente, pode ser acometido pela Doença das Mucosas (Baker, 1995; Flores, 2007; Radostitis et al., 2007).

## **2.2 Epidemiologia**

O BVDV tem distribuição mundial e a prevalência de anticorpos chega a atingir 70 a 80% dos animais e até 80% dos rebanhos (Flores et al., 2005).

Vários relatos clínico-patológicos e sorológicos têm demonstrado a presença da infecção no Brasil desde o final dos anos 60. O primeiro isolamento do vírus no país foi realizado em 1974, no Rio Grande de Sul, a partir do soro de um bezerro (Vidor, 1974). Um abrangente inquérito sorológico foi realizado no período de julho de 1995 a agosto de 1997, no qual foram analisados 4.065 soros bovinos provenientes de rebanhos com problemas reprodutivos de vários estados e 47,7% das amostras foram reagentes ao teste diagnóstico (Pituco & Del Fava, 1998). Melo et al. (1997), encontraram 64,7% de animais reagentes ao analisar amostras de bovinos coletadas em matadouros no estado de Sergipe. Prevalência semelhante aos 61,7% observada por Figueiredo et al. (1997), no estado de Minas Gerais. Estudo posterior, abrangendo o sul de Minas Gerais e noroeste de São Paulo, constatou 57,56% de animais reagentes ao teste de soroneutralização (Samara et al., 2004). Na Paraíba, Thompson et al. (2006) encontraram 22,2% de soroprevalência entre 2.343 amostras de sangue bovino coletadas em 72 propriedades. Em Goiás, Brito et al. (2002) observaram 34,5% de amostras positivas para anticorpos contra o BVDV. Scherer et al. (2002) detectaram, por

meio da soroneutralização, 74,7% de positividade em amostras de soro e leite provenientes do Rio Grande do Sul. No mesmo estado, entre os anos de 1995 e 2004 foram coletadas amostras de sangue bovino de 1.264 propriedades espalhadas por aproximadamente 100 municípios e a prevalência observada foi de 39,33% (Flores et al., 2005). No Maranhão foi demonstrado 61,32% de positividade em 400 amostras de soro de fêmeas bovinas analisadas (Chaves et al., 2010).

A caracterização genotípica de isolados brasileiros de BVDV foi realizada pioneiramente por Canal et al. (1998), demonstrando a presença de BVDV-1 e BVDV-2 no país. A amostra “Soldan”, isolada de um bezerro com diarreia sanguinolenta em 1991 no Rio Grande de Sul, foi a primeira identificada como BVDV-2. Posteriormente, a análise filogenética de 21 isolados brasileiros, revelou que 17 pertenciam ao genótipo BVDV-1 e 4 ao genótipo BVDV-2 (Gil, 1998). Duas destas amostras foram isoladas de animais com doença gastroentérica e respiratória e as outras duas foram obtidas de fetos saudáveis em matadouros. O antissoro produzido contra cada uma dessas amostras demonstrou uma baixa reatividade sorológica cruzada frente a amostras de BVDV-1. Além disso, um estudo filogenético complementar, pela análise de uma sequência do gene da proteína não-estrutural NS3, revelou que os BVDV-2 brasileiros e sul-americanos são geneticamente distintos dos BVDV-2 norte-americanos e europeus, constituindo um subgenótipo a parte, e foram denominados por BVDV-2b (Flores et al., 2002).

As fontes mais importantes de BVDV na natureza são os animais persistentemente infectados (PI). O sangue desses animais pode conter  $10^7$  doses infectantes para cultura celular de vírus por mililitro (Brock et al., 1998). Normalmente são encontrados níveis elevados de vírus na secreção nasal, saliva, lágrimas, sêmen, leite, urina e fezes dos animais PI e outros animais em contato com eles rapidamente se tornam infectados (Houe, 1995). Apesar da introdução de animais PI ser a principal forma de contaminação do rebanho, a aquisição de bovinos durante a fase aguda da doença, sêmen de touros infectados, fêmeas gestando fetos PI e contato com rebanhos vizinhos podem ser responsáveis pela infecção dos plantéis (Flores, 2007).

Embora o BVDV infecte outras espécies animais e a transmissão interespecies ter sido documentada, elas não parecem ser importantes fontes de infecção, apesar de seu exato papel epidemiológico sob diversas condições ainda necessitar de maiores esclarecimentos (Jewett et al., 1990; Løken, 1995; Terpstra et al., 1997; Tessaro et al., 1999). Infecção persistente por

BVDV é registrada em bovinos e, em menor escala, em ovinos e suínos, mas Doença das Mucosas já foi descrita em algumas espécies silvestres, o que sugere que a infecção persistente também é possível (Løken, 1995).

Animais com infecção primária pós-natal são temporariamente infectados, e eventualmente destroem o vírus, mas podem infectar outros animais que convivem próximo a eles, especialmente em rebanhos com baixo nível de imunidade. As secreções e excreções desses animais normalmente contêm o vírus entre o 4<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias pós-infecção, mas variações consideráveis nesse período são relatadas. A quantidade de vírus nas secreções e excreções dos animais temporariamente infectados são milhares de vezes menores que dos animais PI, o que torna a disseminação do vírus muito menos eficiente (Innocent et al., 1997; Kirkland et al., 1997; Potgieter, 2004).

Sêmen de touros PI contêm altas concentrações de BVDV e podem resultar em baixas taxas de concepção em matrizes susceptíveis após o cruzamento ou inseminação. As fêmeas inseminadas geralmente se tornam temporariamente infectadas e, em alguns casos, produzem bezerros persistentemente infectados. Com o sêmen de touros temporariamente infectados, apenas uma pequena proporção de fêmeas soronegativas se tornam infectadas, infecção fetal ocorre ocasionalmente e uma redução significativa da taxa de concepção é mais rara, embora possam ocorrer ciclos secundários de transmissão a partir dessas fêmeas, aumentando o prejuízo (Kirkland et al., 1997; Kommisrud et al., 1996).

A transmissão horizontal do BVDV pode ocorrer por contato direto ou indireto. A transmissão ocorre mais eficientemente pelo contato focinho a focinho de animais susceptíveis com animais persistentemente infectados. A transmissão por aerossóis através de curtas distâncias ocorre, mas a probabilidade de transmissão diminui rapidamente à medida que a distância entre os animais aumenta. O potencial de transmissão indireta depende da estabilidade do vírus fora do hospedeiro. Estudos laboratoriais sugerem que o vírus é bem estável abaixo de 10<sup>o</sup> C e em uma larga faixa de pH (3 a 9). O vírus pode sobreviver em ambiente natural por 3 horas a 35<sup>o</sup> C, de 3 a 7 dias a 20<sup>o</sup> C e 3 semanas a 5<sup>o</sup> C (Houe, 1995). Transmissão mecânica do vírus através da picada de insetos foi relatada por Tarry et al. (citado por Houe, 1995). Infecção iatrogênica pode ocorrer pelo uso de agulhas contaminadas, “formigas” de contenção nasal, furadores de orelha para colocação de brincos, instrumentos usados em castração, luvas de palpação para exames retais em série e possivelmente por fômites (Potgieter, 2004).

A sequência de eventos após a introdução de um animal persistentemente infectado em um rebanho susceptível geralmente segue um padrão previsível. Inicialmente, sinais clínicos de infecção primária pós-natal podem se desenvolver, sendo imediatamente seguidos por falhas reprodutivas, com as fêmeas apresentando repetição de cio por alguns meses e depois abortamentos por vários meses. Bezerros com defeitos congênitos podem nascer em sequência, seguidos pelo nascimento de animais persistentemente infectados. Os animais PI normalmente nascem 5 a 9 meses após a ocorrência dos primeiros sinais clínicos de infecção temporária, sendo que alguns podem ter defeitos congênitos e muitos são mais susceptíveis a outras doenças. Entretanto, é raro encontrar todas as manifestações clínicas no mesmo rebanho, pois depende de fatores como a natureza do padrão de transmissão, a imunidade do rebanho no momento da infecção, o estado de prenhez dos animais no momento da infecção e a virulência do vírus introduzido. Em muitos casos a infecção transitória inicial pode ser muito branda, a ponto de passar despercebida e as primeiras manifestações da doença podem ser as desordens reprodutivas. Os primeiros abortamentos podem ocorrer três semanas após a infecção transitória no rebanho (Moerman et al., 1994; Potgieter, 2004).

## **2.3 Patogenia e Sinais Clínicos**

### **2.3.1 Infecção primária pós-natal**

O vírus inicialmente se replica na mucosa oro-nasal e alcança altas concentrações nas tonsilas. Depois se espalha para os linfonodos regionais e se dissemina para o resto do corpo associado aos leucócitos, possuindo tropismo pelas células das linhagens germinativas nos testículos e ovários, células do timo, placas de Peyer e células do feto (Grooms, 2004; Ellis et al., 1998; Spagnuolo et al., 1997; Wilhelmsen et al., 1990).

A manifestação da maioria das infecções primárias pós-natais pelo BVDV são triviais e caracterizadas somente por febre branda, leucopenia e ocasionalmente diarreia. No entanto, nas últimas duas décadas, vários surtos de BVD severa foram relatados, principalmente na América do Norte e Reino Unido, associados na maioria das vezes ao genótipo 2 (Pellerin et al., 1994; Wilhelmsen et al., 1990). Aparentemente os isolados do genótipo 2 afetam mais os trombócitos que os isolados clássicos do genótipo 1. Entretanto, alguns isolados do genótipo 1

também tem a capacidade de prejudicar o funcionamento das plaquetas, com trabalhos experimentais mostrando enorme variação nas capacidade dos isolados em induzir trombocitopenia, com os animais apresentando extensas hemorragias em alguns casos (Walz et al., 1999).

Megacariócitos e linfócitos são outros alvos importantes do vírus, sofrendo necrose. E aqueles que sobrevivem à infecção têm a função prejudicada (Walz et al., 1999). Osteopetrose, como consequência de uma interrupção temporária na ossificação endocondral, também tem sido associada com a infecção pelo BVDV (Scruggs et al., 1995). Altas concentrações do vírus também têm sido detectadas nas ilhotas de Langerhans, no pâncreas e na glândula pituitária de animais infectados experimentalmente (Spagnuolo et al., 1997).

A infecção primária pós-natal pode causar três quadros clínicos distintos:

*- Infecção subclínica ou BVD branda -*

Esta é a consequência mais comum da infecção primária pós-natal. Por volta de 70 a 90% do gado infectado não desenvolve sinais óbvios da doença. Uma observação mais detalhada pode revelar leucopenia, leve aumento de temperatura e queda na produção de leite em algumas vacas. Os animais se tornam virêmicos de 4 a 15 dias após a infecção inicial e desenvolvem anticorpos contra o BVDV em 2 a 4 semanas após a exposição (Potgieter, 2004).

*- Diarreia Viral Bovina -*

Se os sinais clínicos são evidentes, então nos referimos à doença como Diarreia Viral Bovina. Surtos de diarreia aquosa, de várias intensidades, podem ocorrer em rebanhos susceptíveis, geralmente envolvendo animais entre 6 e 12 meses de idade. Tipicamente a taxa de mortalidade é quase nula, mas já foi relatado até 8%. A taxa de morbidade pode variar de 30 a até 90%. Os sinais clínicos geralmente se manifestam por 5 a 7 dias e podem incluir: febre transitória, leucopenia, depressão, anorexia, hiperpnéia, descargas óculo-nasais, salivação, úlceras e erosões orais, diarreia e queda na produção leiteira (Potgieter, 2004).

*- BVD severa/Síndrome hemorrágica -*

Nos últimos anos uma forma severa e algumas vezes fatal da infecção aguda por BVDV não-citopático tem ocorrido, principalmente no Reino Unido e América do Norte. A doença é caracterizada por um aparecimento súbito de depressão, pirexia, leucopenia,

trombocitopenia, diarreia, descarga nasal, salivacão, úlceras orais e queda na produção de leite. Já foram relatadas taxas de morbidade de até 40% e taxa de mortalidade entre 10 e 25%. Em alguns surtos as características da doença incluem pneumonia e/ou síndrome hemorrágica. A síndrome hemorrágica é caracterizada por diarreia sanguinolenta, epistaxe, petéquias e equimoses largamente difundidas, sangramento em locais de injeção e ocasionalmente hifema. Os surtos geralmente são associados à recente introdução de animais no rebanho e a programas de vacinação inadequados, sendo também, na maioria das vezes, associados ao BVDV do genótipo 2 (Potgieter, 2004).

### **2.3.2 Infecção pré-natal (uterina)**

*- Infecção antes da concepção até a fase embrionária (-9 a 45 dias de gestação) -*

Estudos de campo e epidemiológicos mostram que a infecção pelo BVDV no início da gestação tem um efeito muito significativo na performance reprodutiva. Em um plantel soronegativo, exposto acidentalmente, a uma vaca PI, as taxas de concepção nos grupos que soroconverteram para BVDV, antes, durante ou depois do cruzamento foram 78,6%, 44,4% e 22,2% respectivamente (Virakul et al., 1988). As matrizes que soroconvertem nos dias do cruzamento ou pouco depois, tem menor probabilidade de engravidar do que as que soroconvertem antes. Semelhantemente, McGowan et al. (1993) compararam novilhas soropositivas para BVDV com novilhas que soroconverteram entre o cruzamento e o diagnóstico de prenhez aos 51 dias, encontrando uma taxa de prenhez significativamente reduzida para o último grupo. Em um estudo experimental a taxa de concepção de novilhas infectadas pela via intranasal, 9 dias antes da inseminação, foi 44%, enquanto a do grupo controle foi 79%. Essa redução na taxa de concepção foi atribuída tanto à falha na fertilização quanto à morte embrionária precoce. No mesmo estudo, a taxa de concepção em novilhas expostas a uma vaca e bezerro PI, por 4 dias após a inseminação, foi 60%. Entretanto ocorreu uma significativa perda embrionária neste grupo, resultando em uma taxa de prenhez aos 77 dias, de apenas 33%, enquanto a do grupo controle foi 79% (McGowan et al., 1993).

O mecanismo para as taxas de concepção reduzidas ainda não está claro, mas depende do momento da infecção em relação aos eventos reprodutivos precoces. O vírus tem sido encontrado em tecido ovariano por longos períodos após uma infecção aguda e também em fluido folicular coletado em ovários de abatedouros (Ssentongo et al., 1980; Grooms et al., 1998a; Grooms et al., 1998b; Bielanski et al., 1993). A exposição de ovócitos em desenvolvimento ao BVDV resulta em uma capacidade reduzida de sobrevivência, tanto pelo



dano celular direto como indiretamente devido a mudanças no ambiente local. Ooforite intersticial, com as lesões durando até 60 dias, é descrita após uma infecção aguda com BVDV citopático. Uma ooforite longa pode resultar em mau funcionamento ovariano permanente, levando a baixas taxas de concepção (Ssentongo et al., 1980; Grooms et al., 1998b). Em um estudo com vacas sendo superovuladas, o grupo desafiado experimentalmente com BVDV apresentou número significativamente menor de corpos lúteos palpáveis e de embriões recolhidos (Kafi et al., 1994). Infecção e subsequente viremia durante a fase pré-ovulatória pode resultar em menor taxa de crescimento folicular (Grooms et al., 1998c; Fray et al., 1999). A infecção pelo BVDV também altera a secreção hormonal ovariana (Fray et al., 1999; Fray et al., 2000; Fray et al. 2002) e vacas PI geralmente tem os ovários hipoplásicos e com menor número de folículos antrais (Grooms et al., 1996). Avaliados em conjunto, esses estudos mostram que a infecção pelo BVDV altera a dinâmica ovariana e essas mudanças, consequentemente levam a uma redução na fertilidade, que pode ser temporária ou permanente (Grooms, 2004).

Archibald et al. (1979) deram evidências de que o BVDV pode interferir no desenvolvimento embrionário inicial. Vacas superovuladas tiveram BVDV infundido em um corno uterino e a qualidade dos embriões coletados do corno infectado foi reduzida em relação aos coletados do corno não infectado. Embora o BVDV possa ter um efeito direto no desenvolvimento embrionário, as alterações inflamatórias no útero após a infecção podem resultar em um ambiente incompatível com o desenvolvimento embrionário. Em estudos experimentais, alterações histológicas foram evidentes no útero e no oviduto, de 6 a 21 dias pós-infecção (Archibald et al., 1973).

Estudos *in vitro* mostraram que a zona pelúcida intacta protege as células embrionárias da infecção pelo BVDV e permite o desenvolvimento normal (Singh et al., 1982; Potter et al., 1984). Em embriões no estágio de mórula e blastocisto ainda não eclodido, não foram observados efeitos citopáticos em 48 horas após exposição ao BVDV citopático (Bielanski & Hare, 1988). Semelhantemente, embriões com a zona pelúcida intacta, expostos a células epiteliais do oviduto infectadas com BVDV não-citopático, não apresentaram efeitos adversos nas suas taxas de crescimento (Zurovac et al., 1994). Em contraste, blastocistos eclodidos da zona pelúcida (8º dia de gestação) apresentaram menor viabilidade quando expostos ao BVDV citopático *in vitro*, enquanto o BVDV não-citopático não afetou sua capacidade de sobrevivência (Brock & Stringfellow, 1993).

*- Infecção após a fase embrionária (45 a 175 dias de gestação) -*

Após a implantação, a infecção transplacentar do feto em desenvolvimento pode ocorrer em vacas susceptíveis, por qualquer biótipo do BVDV. A consequência da infecção é dependente do momento da infecção, da imunocompetência do feto, do biótipo viral envolvido e da virulência do vírus. Embora o mecanismo da infecção fetal não seja claro, evidências sugerem que o BVDV atravesse a placenta causando vasculite na porção materna da placenta, ganhando assim acesso à circulação fetal (Fredriksen et al., 1999).

Abortamento

Abortamento associado à infecção pelo BVDV foi descrito pela primeira vez em 1946 (Olafson, 1946). Os primeiros estudos envolvendo infecção experimental com BVDV resultaram em abortamento, embora o vírus não tenha sido isolado do feto (Baker et al., 1954; Huck, 1957), mas posteriormente tanto o biótipo não-citopático (Gillespie et al., 1967) quanto o citopático (Shope, 1968; Scott et al., 1972) foram isolados de fetos abortados e já foi demonstrado que ambos os biótipos podem causar morte fetal após a infecção em matrizes soronegativas (Brownlie et al., 1989; Done et al., 1980; Liess et al., 1984). Em rebanhos onde a infecção é endêmica e não há programas de controle é estimado que 7% das mortes fetais sejam atribuídas à infecção pelo BVDV (Rufenacht et al., 2001).

Morte fetal por infecção pelo BVDV em fêmeas susceptíveis é mais comum no terço inicial da gestação, mas pode ocorrer a qualquer momento, não podendo ser descartada em casos onde os abortamentos no terço final sejam predominantes (Done et al., 1980; Duffell & Harkness, 1985; Sprecher et al., 1991). Dependendo do momento da infecção pode ocorrer reabsorção fetal, mumificação ou expulsão do feto (Casaro et al., 1971; Done et al., 1980).

Em pesquisas laboratoriais nos Estados Unidos, o BVDV foi isolado em 0,1% (Yamini et al., 1990), 1,5% (Anderson et al., 1990), 4,54% (Kirkbride, 1992) e 27,2% (Woodard, 1994) dos casos de aborto avaliados. Dos casos de aborto apresentados ao Ministério da Agricultura de Ontario no Canadá entre 1993 e 1995, 4,1% foram causados pelo BVDV (Alves et al., 1996). No Reino Unido, BVDV foi isolado de 27% dos casos de aborto examinados (Murray, 1990; Murray, 1991).

A morte fetal geralmente ocorre entre 10 e 27 dias após a exposição ao vírus e a expulsão do feto ocorre até 50 dias depois (Murray, 1991). Por causa desse longo intervalo entre a morte fetal e o diagnóstico de abortamento, as lesões observadas no feto e na placenta

geralmente são inconclusivas e o vírus nem sempre é isolado com sucesso (Baker, 1987). Em condições experimentais ou quando o feto abortado é expelido logo após a morte, as lesões observadas incluem conjuntivite, pneumonia peribronquiolar e interalveolar e miocardite não específica. As lesões na placenta consistem principalmente de vasculite, edema, congestão e hemorragia, com alguma degeneração e necrose (Jubb et al., 1985; Murray, 1990).

### Imunotolerância

Fetos que sobrevivem à infecção pelo BVDV não-citopático entre 18 e 125 dias de gestação desenvolvem imunotolerância ao vírus e se tornam persistentemente infectados (PI) pelo BVDV. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez em um touro aparentemente saudável (Coria & McClurkin, 1978), e posteriormente reproduzido experimentalmente (Liess et al., 1984; McClurkin et al., 1984). Embora o exato mecanismo da imunotolerância não esteja esclarecido, é sabido que a circulação do vírus durante o período gestacional em que a imunocompetência esteja se desenvolvendo (90 a 120 dias) é um pré-requisito para a persistência. Proteínas virais são reconhecidas como antígenos próprios, gerando seleção negativa de linfócitos B e T específicos para BVDV durante sua formação, o que resulta em ausência de anticorpos contra o vírus persistente. Não está claro o exato estágio do desenvolvimento fetal em que a infecção deve ocorrer para causar imunotolerância, mas sob condições experimentais a persistência ocorreu em 86% e 100% dos bezerros nascidos de vacas infectadas com BVDV no 18º e 30º dia de gestação, respectivamente (Kirkland et al., 1993). Em outros estudos a infecção persistente foi induzida em 100% dos fetos originados de matrizes desafiadas aos 75 dias de gestação (Brock & Chase, 2000; Brock & Cortese, 2001; Cortese et al., 1998). A infecção persistente é rara se a infecção fetal ocorrer após o 100º dia, mas já foi relatada após infecção no dia 125 de gestação (Baker, 1995). O biótipo não-citopático é o único que já foi observado como sendo capaz de produzir a infecção persistente, sendo que infecções experimentais com o BVDV citopático falharam em produzir bezerros PI (Brownlie et al., 1989; Casaro et al., 1971; McClurkin et al., 1984).

### Defeitos Congênitos

A infecção fetal entre 100 e 150 dias de gestação, também chamada de infecção congênita, geralmente resulta no desenvolvimento de uma variedade de defeitos congênitos. Durante este estágio da gestação a organogênese está se completando e o sistema imune se tornando totalmente funcional. E embora os mecanismos ainda não estejam esclarecidos, é

proposto que a combinação do dano celular direto pelo vírus e as respostas inflamatórias ao vírus sejam os mecanismos patogênicos (Castrucci et al., 1990).

As anomalias congênitas envolvendo o sistema nervoso central são as mais comuns após a infecção fetal pelo BVDV. Estas incluem microencefalopatia, hidrocefalia, hidroanencefalia (Badman et al., 1981), porencefalia (Hewicker-Trautwein & Trautwein, 1994), hipoplasia cerebelar (Kahrs et al., 1970; Scott et al., 1973) e hipomielinização (Binkhorst et al., 1983). A hipoplasia cerebelar foi o primeiro efeito teratogênico do BVDV reconhecido, e já foi muito bem documentada (Kahrs et al., 1970; Scott et al., 1973; Ward et al., 1969; Wilson et al., 1983). Ao nascimento, os bezerros com hipoplasia cerebelar mostram extrema dificuldade em se tornarem capazes de andar. Os que conseguem ficar de pé tem ataxia, tremores, a base estendida e tropeçam. Geralmente os defeitos são incompatíveis com a vida e pode ser necessária a eutanásia (Baker, 1987).

Outros efeitos teratogênicos associados ao BVDV incluem: catarata (Bielefeldt-Ohmann, 1984), microftalmia (Brown et al., 1975; Kahrs et al., 1970; Scott et al., 1973), degeneração da retina (Scott et al., 1973), hipoplasia do timo (Done et al., 1980), hipotricose/alopecia (Baker, 1987; Kendrick, 1971), enrolamento do pelo (Larsson et al., 1991), osteogênese imperfeita (Constable et al., 1993), braquignatismo mandibular (Scott et al., 1972) e retardo no crescimento (Baker, 1987; Constable et al., 1993; Done et al., 1980).

*- Infecção na gestação tardia (125 a 285 dias de gestação) -*

Nos últimos estágios da gestação a organogênese se completa e o animal se torna imunocompetente, mas ainda pode ocorrer abortos ou o nascimento de bezerros fracos. Normalmente o feto neste estágio é capaz de montar uma resposta imune eficiente contra o vírus e nascem com anticorpos neutralizantes pré-colostrais (Braun et al., 1973; Casaro et al., 1971; Kendrick, 1971; Orban et al., 1983).

Entretanto, os bezerros infectados congenitamente pelo BVDV podem ter um risco maior de enfrentar algum sério distúrbio à saúde, após o nascimento. Em um estudo visando definir o impacto da BVD congênita em grandes fazendas leiteiras, Munoz-Zanzi et al. (2003) mostram que bezerros nascidos com títulos neutralizantes de anticorpos contra o vírus são duas vezes mais propensos a enfrentar uma doença severa durante seus 10 primeiros meses de vida quando comparados a bezerros que nascem sem os anticorpos. Mas ainda são necessários estudos para determinar os efeitos em longo prazo.

### 2.3.3 Doença das Mucosas

Doença das Mucosas (DM) é uma severa consequência tardia da infecção intrauterina, ocorrendo quando um animal PI é infectado por um vírus citopático, antígenicamente homólogo ao vírus não-citopático residente no hospedeiro (Bolin, 1995). Provavelmente o vírus citopático é, na maioria das vezes, derivado do vírus não-citopático residente, sendo criado por rearranjo molecular de seu genoma, mas a origem também pode ser externa, como ocorre nos surtos associados à vacinação (Donis, 1995). A mutação responsável por converter o biótipo do vírus residente no animal PI não afeta a antigenicidade, assim o novo biótipo não é combatido pelo sistema imune (Potgieter, 2004). Uma hipótese é que o BVDV citopático se espalha pelo hospedeiro, causando, entre outras lesões, a depleção progressiva do tecido linfóide associado ao intestino e necrose de sua mucosa sobrejacente. Inicialmente o vírus citopático é mais encontrado nas tonsilas, linfonodos, placas de Peyer e nódulos linfáticos do intestino grosso e posteriormente, uma distribuição difusa do vírus pelo epitélio intestinal parece corresponder ao advento da doença clínica (Liebler-Tenorio et al., 1997; Lopez et al., 1993). A destruição celular causada pelo BVDV citopático é mediada pela morte celular programada (apoptose) (Adler et al., 1997; Lambot et al., 1998; Zhang et al., 1996).

A DM geralmente é esporádica, acometendo, principalmente, animais de 6 a 24 meses de idade. A taxa de morbidade é baixa (menos de 5%), mas surtos afetando uma porcentagem relativamente alta de animais, já foram relatados. A taxa de letalidade é próxima de 100%. Ocasionalmente, um bezerro persistentemente infectado desenvolve sinais transitórios de DM, o que sugere que a recuperação é possível, porém parece ser um evento raro. Existem duas formas de DM, a aguda e a crônica, que tem um curso mais prolongado (Potgieter, 2004).

Quando aguda, a DM é caracterizada por pirexia, depressão, fraqueza, anorexia, taquicardia, hiperpneia, diarreia aquosa profusa que pode ser hemorrágica, desidratação, acidose e emaciação. Erosões, ulcerações e grandes áreas de necrose de mucosas envolvendo os lábios, gengivas, língua, palato e comissuras labiais geralmente estão presentes. Lesões similares também podem se desenvolver no focinho, cavidade nasal, vulva e tetas. Salivação e descarga ocular mucopurulenta de severidade variada são sinais comuns. Às vezes ocorre edema de córnea. As fezes são aquosas e frequentemente mal cheirosas, podendo conter debris necróticos, sangue e fibrina. A diarreia normalmente se desenvolve 2 ou 3 dias após o início dos sinais clínicos, mas em casos hiperagudos o animal pode morrer antes de ela estar evidente. O curso da DM aguda varia de 2 a 21 dias. Uma leucopenia severa, manifestada por

neutropenia (sem desvio a esquerda) e por linfopenia pode estar evidente já nos estágios iniciais da doença. Frequentemente ocorre trombocitopenia. Infecções por patógenos oportunistas são comuns nesses animais (Potgieter, 2004). Há um relato da ocorrência de diabetes mellitus em animais que sofrem de DM (Tajima et al., 1992).

Os sinais clínicos da DM crônica são semelhantes aos da forma aguda, porém menos severos e seu curso é prolongado (até 18 meses). A doença é caracterizada por anorexia, emaciação progressiva, descargas óculo-nasais e diarreia contínua ou intermitente. Um inchaço crônico pode ser uma característica. Lesões de pele são comuns nos animais afetados cronicamente e normalmente se manifestam por áreas de alopecia e hiperqueratose ou eczema na região do pescoço, erosões crônicas na região perineal, vulva, abertura prepucial, junção da pele com o chifre, fendas interdigitais, talões e paradígitos. Anemia, neutropenia e linfopenia geralmente estão presentes e as infecções secundárias são comuns (Potgieter, 2004).

### **2.3.4 Imunossupressão**

Existem muitas evidências de que o BVDV é um componente essencial em várias doenças infecciosas multi-etiológicas (Potgieter, 1995; Potgieter, 1997). BVDV, associado a outros patógenos em potencial, é frequentemente encontrado em tecidos doentes e pode ser o denominador comum na patogenia dessas doenças (Richer et al., 1988; Stott et al., 1980). Ele é encontrado com muita frequência em tecidos doentes do trato respiratório infectados por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* e/ou Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1), o agente causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (Woods et al., 1973). A possível participação do BVDV em infecções sinérgicas geralmente não é reconhecida porque as lesões clássicas da BVD e/ou DM não estão presentes, mas ele tem o potencial de aumentar a patogenicidade de outros patógenos ou de mudar as características das doenças causadas por estes outros patógenos (Potgieter et al., 1985; Roberts et al., 1988; Yates, 1986).

A infecção concomitante de BVDV e BHV-1 em bovinos tem resultado em doença severa do trato respiratório, tecidos oculares e trato digestório e muitas vezes a infecção, aparentemente oportunista, por *M. haemolytica* aumenta ainda mais a severidade das lesões do trato respiratório (Greig et al., 1981; Thomas et al., 1977). Entre outras doenças que o BVDV pode exacerbar estão incluídas a actinomicose, estomatite papular, enterite causada por *Salmonella* e *Escherichia coli*, babesiose, helmintoses agudas, metrite e mastite (Bohac & Yates, 1980; Brun-Hansen et al., 1998; Penny et al., 1996). Outra consequência da infecção

intercorrente pelo BVDV pode ser um prolongamento incomum de doenças causadas por outros organismos (Polreis, 1995; Potgieter, 1995).

O potencial de sinergismo entre o BVDV e outros patógenos é comprovado por diversas evidências laboratoriais que indicam que o BVDV causa uma ampla deficiência na resposta imune dos bovinos (Atluru et al., 1990; Diderholm & Dinter, 1966; Gudapty & Atluru, 1992; Ketelsen et al., 1979; Larsson, 1988; Markham & Ramnaraine, 1985; Muscoplat et al., 1973; Rossi et al., 1980; Truitt & Shechmeister, 1973). O vírus tem afinidade por células imunocompetentes e uma consequência da infecção é a destruição de algumas dessas células (Truitt & Shechmeister, 1973). O funcionamento prejudicado das células sobreviventes, contudo, é a consequência da infecção que pode ser a causa mais importante da subsequente imunossupressão induzida por este vírus (Atluru et al., 1979; Brown et al., 1991; Ketelsen et al., 1979; Roth et al., 1981; Roth et al., 1983).

Na maioria dos bovinos infectados ocorre leucopenia transitória e a depleção do tecido linfóide é um achado frequente na necropsia. Os animais persistentemente infectados possuem uma menor proporção de linfócitos B circulantes funcionais e a produção de anticorpos contra vários microrganismos é prejudicada, mas a quantidade absoluta de linfócitos continua relativamente normal (Atluru et al., 1979; Bolin et al., 1985; Johnson & Muscoplat, 1973; Larsson, 1988). Já os bovinos que sofrem infecção primária pós-natal tem redução do número absoluto de linfócitos B e T, além da porcentagem reduzida de linfócitos T e neutrófilos (Bolin et al., 1985; Ellis et al., 1988).

## **2.4 Diagnóstico**

Para melhor fechar o diagnóstico é importante que o clínico e o laboratório estejam cientes das razões de se realizarem os testes e que compartilhem todas as informações levantadas sobre o caso. Isto é importante, porque nem todos os testes diagnósticos para BVD são aplicáveis em todos os casos. Estão apresentadas a seguir, as principais razões para solicitar um teste diagnóstico para BVD.

- Infecção primária pós-natal/Doença Clínica -

São muitas as formas de manifestações clínicas que podem ocorrer após a infecção de um animal susceptível, variando desde uma BVD branda até uma síndrome hemorrágica fatal, com erosões gastrointestinais. O que o clínico necessita nesses casos é estabelecer a causa da síndrome observada (Saliki & Dubovi, 2004).

- Falhas Reprodutivas -

A infecção pelo BVDV está sempre na lista de diagnósticos diferenciais para abortamentos ou falhas reprodutivas em bovinos. A infecção de vacas susceptíveis pode resultar em infecção subclínica, reabsorção fetal, retorno ao cio, abortamento, nascimento de bezerros aparentemente saudáveis mas persistentemente infectados ou bezerros pequenos e com retardo no crescimento. As amostras para diagnósticos podem ser coletadas tanto da mãe como do feto ou do bezerro (Saliki & Dubovi, 2004).

- Detecção e eliminação de animais persistentemente infectados -

Os animais PI com BVDV constituem o mecanismo pelo qual o vírus persiste e se espalha pelo rebanho. Sua detecção e eliminação devem ser a lógica a ser seguida em qualquer diagnóstico de BVD em um rebanho (Saliki & Dubovi, 2004).

- Teste de eficácia de vacinas -

Está bem estabelecido que a presença de anticorpos neutralizantes no sangue corresponde à proteção fornecida pela vacinação contra BVDV. Portanto os níveis de anticorpos no soro são indicadores úteis da eficácia das vacinas (Saliki & Dubovi, 2004).

- Controle de qualidade de produtos biológicos -

O BVDV é um contaminante frequente em produtos biológicos derivados de bovinos. Em particular, o soro fetal bovino (SFB) comercial - um componente da maioria dos meios de cultura celular - muitas vezes contem BVDV vivo. A frequência da ocorrência de BVDV no SFB comercial não corresponde à frequência de fetos virêmicos na população, pois uma partida do produto é oriunda de dezenas de animais e pode ser contaminada por um único animal virêmico. E embora a presença de anticorpos contra BVDV no SFB comercial não seja considerada uma contaminação para a maioria de seus propósitos, eles podem interferir no isolamento viral e nos testes de soro neutralização. Portanto os testes de qualidade do SFB



comercial devem envolver tanto a detecção do vírus quanto dos anticorpos (Saliki & Dubovi, 2004).

- Genotipagem -

Existem suspeitas de que determinados genótipos de BVDV estejam relacionados a determinadas manifestações clínicas (Fulton et al., 2002; Fulton et al., 2003). Portanto pode haver a necessidade de estabelecer qual o genótipo do isolado de BVDV envolvido em determinada situação. Além disso, a genotipagem pode ser necessária por razões epidemiológicas. Por exemplo, se ocorrer um surto de BVD em um rebanho vacinado, pode ser útil determinar se o genótipo causador da doença é diferente do genótipo usado na vacina (Saliki & Dubovi, 2004).

### **2.4.1 Métodos de diagnóstico**

- Isolamento Viral -

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico de BVD, o cultivo seguido da identificação viral continua sendo considerada a técnica padrão para o diagnóstico. O vírus rapidamente se multiplica em diversas linhagens celulares de várias espécies animais. Entretanto as linhagens celulares mais utilizadas pelos laboratórios são: células de turbinados bovinos (BT - bovine turbinate), células de testículo bovino (Btest - bovine testicle) e células de rim bovino Madin Darby (MDBK - Madin Darby bovine kidney). Há evidências de que as células BT e Btest são mais sensíveis ao BVDV que as células MDBK e outras linhagens celulares contínuas. Outro fator que afeta o cultivo do BVDV é seu método de inoculação. A sensibilidade do método é inversamente proporcional à distância que as partículas virais têm de percorrer no meio de cultura até alcançar a camada de células. Mas esse problema pode ser evitado se o inóculo for adsorvido diretamente na camada de células por 1 a 2 horas antes de se adicionar todo o meio de cultura (Saliki & Dubovi, 2004).

Nos animais vivos, a melhor amostra para o isolamento do BVDV é o sangue total, do qual são extraídos os glóbulos brancos (camada leucoplaquetária) e usados como inóculo. Já nos fetos abortados ou nos animais necropsiados as melhores amostras são coletadas dos órgãos linfóides como o baço, placas de Peyer do intestino delgado, linfonodos mesentéricos e timo. Outras amostras frequentemente utilizadas como o soro sanguíneo, swab nasal, fezes, sêmen e outros tecidos, podem não ser boas para o isolamento, em caso de suspeita de infecção primária pós-natal, devido à interferência causada pelos anticorpos neutralizantes.

Exceto os animais PI, onde a quantidade de vírus no organismo é tão grande que praticamente qualquer secreção, excreção ou amostra de tecido é satisfatória para o isolamento (Saliki & Dubovi, 2004).

Um período de incubação de 4 a 5 dias já é suficiente para o isolamento. Caso a cepa seja citopática, é possível visualizar seus efeitos na cultura celular. Já para detectar cepas não-citopáticas é necessário realizar testes complementares como a coloração por imunofluorescência e/ou imunoperoxidase. A imunofluorescência com anticorpos policlonais é amplamente reativa, podendo causar uma coloração de fundo, não específica, o que torna a leitura difícil e pode resultar em falso positivo. Os anticorpos monoclonais produzem uma coloração mais limpa e fácil de ler, mas é preciso cuidado para garantir que eles sejam reativos contra todos os tipos de BVDV para evitar falso negativo. Na verdade, devido a ampla variação antigênica do BVDV, existem poucos anticorpos monoclonais que são amplamente reativos contra todos os BVDV (Saliki & Dubovi, 2004).

Para se trabalhar com um grande número de amostras, como por exemplo, no rastreamento de rebanho para identificar animais PI, o ensaio de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA), usando o soro sanguíneo como amostra, é largamente utilizado (Saliki et al., 1997). Essencialmente, o soro é inoculado em células BT ou Btest para o crescimento do BVDV em placas de 96 poços. No final do 4º dia de incubação as placas são fixadas com acetona 20%, secadas, e a presença do BVDV é determinada por ELISA ou coloração pela imunoperoxidase. Embora este método seja muito acurado e confiável para testar animais PI, ele não é sensível o suficiente para diagnosticar infecções agudas. A maior limitação do IPMA na procura por animais PI é que ele não pode ser utilizado em animais com menos de 3 meses de idade, devido à interferência dos anticorpos maternos no crescimento do BVDV na cultura celular (Saliki & Dubovi, 2004).

#### - Detecção de Antígeno -

A detecção de antígenos diretamente nas amostras é mais rápida e barata que o isolamento viral. Entretanto, a maioria dos métodos de detecção direta de antígenos não apresentam a sensibilidade e confiabilidade do isolamento viral, podendo não servir como teste final para descartar a BVD. Os métodos disponíveis se dividem em duas categorias, os testes ELISA de captura de antígeno e os testes por coloração imunológica em tecidos frescos ou fixados em formalina e parafinados (Saliki & Dubovi, 2004).

Vários testes ELISA de captura de antígenos têm sido descritos (Entrican et al., 1995; Fenton et al., 1991; Mignon et al., 1992; Sandvik et al., 1995) e pelo menos dois são atualmente disponíveis em kits comerciais (Graham et al., 1998; Saliki et al., 2000). Estes testes são úteis no rastreamento de animais PI no rebanho, mas não são confiáveis para o diagnóstico de infecções agudas. A maioria deles precisa de amostras celulares, como a camada leucoplaquetária do sangue e biópsias de tecidos, mas um dos testes comerciais é confiável na detecção de antígenos no soro sanguíneo de animais PI (Saliki et al., 2000; Plavsic & Prodafikas, 2001).

Detecção de antígenos por imunofluorescência em cortes de tecidos congelados também é usada como teste de rastreamento. Quando lidos e interpretados corretamente, os resultados positivos são confirmatórios de BVD, porém os resultados negativos não descartam a BVD devido à relativa falta de sensibilidade deste método (Saliki & Dubovi, 2004).

Nos últimos anos, a detecção de antígenos do BVDV em tecidos fixados em formalina e parafinados usando coloração por imunohistoquímica tem sido largamente utilizada no diagnóstico de infecções agudas e animais PI (Haines et al., 1992; Saliki & Dubovi, 2004). Mais recentemente a coloração por imunohistoquímica em biópsias de pele coletadas na orelha tem ganhado grande aplicabilidade no rastreamento de animais PI no rebanho (Grooms & Keilen, 2002; Njaa et al., 2000; Ridpath et al., 2002).

- Detecção de Ácido Nucleico amplificado/Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) -

Para se amplificar a molécula de RNA é preciso inicialmente usar uma enzima Transcriptase Reversa para sintetizar moléculas de DNA complementar (cDNA) e depois amplificá-lo pela Reação da Polimerase em Cadeia (RT-PCR). Nos últimos 15 anos a RT-PCR tem aumentado sua participação nas rotinas para diagnóstico de BVD e já existem protocolos descritos para diversos tipos de amostras, incluindo leite, urina, sêmen, sangue total, soro, swabs, pele e outros tecidos frescos ou fixados em formalina (Ridpath et al., 2002; Da Silva et al., 1995; Deregt et al., 2002; Gilbert et al., 1999; Hamel et al., 1995; Hyndman et al., 1998; Kim & Dubovi et al., 2003; Pfeffer et al., 2000; Schmitt et al., 1994).

Devido à ampla variedade genética do BVDV é preciso muito cuidado com os “primers” utilizados (oligonucleotídeos que se ligam a regiões específicas do genoma e determinam a região amplificada), para que sejam reativos a todos os genótipos conhecidos. O isolamento do RNA da amostra também é crítico e afeta a sensibilidade do procedimento. É

recomendado que se utilize um controle positivo interno assim como reações separadas, para detectar falsos negativos devido à preparação da amostra (Finke et al., 1993).

A alta sensibilidade analítica da RT-PCR permite analisar conjuntos de amostras para reduzir o custo do método, especialmente no rastreamento do rebanho à procura de animais PI. Uma única amostra positiva pode ser detectada em um conjunto de dezenas de amostras (Munoz-Zanzi et al., 2000; Renshaw et al., 2000).

A detecção do ácido nucleico amplificado é tipicamente realizada por eletroforese em gel de agarose após tratamento com brometo de etídio, porém já existem as técnicas de RT-PCR em tempo real, que utilizam sondas fluorescentes tipo TaqMan® ou faróis moleculares (molecular beacons) (Mahlum et al., 2002).

#### - Sorologia -

A sorologia mede a resposta do sistema imune do animal (produção de anticorpos) à exposição a um agente infeccioso, tanto por exposição natural como por protocolos de imunização. Para o BVDV estes testes se limitam ao ensaio de Soro Neutralização ou teste ELISA. Mas parece haver pouca concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos, chegando a um coeficiente de correlação de apenas 0,15 em um estudo (Taylor et al., 1995). Um dos principais motivos de tanta variação é a estirpe viral utilizada nos ensaios, que pode ter fraca reação contra alguns genótipos do BVDV e estimar uma titulação de anticorpos inferior ao título real. A estirpe utilizada no ensaio tem muita importância na interpretação de resultados para avaliação do sucesso de um protocolo de imunização, pois pode não corresponder às estirpes utilizadas na vacina (Saliki & Dubovi, 2004).

Outro fator de variação, porém mais sutil, é o tipo celular usado no ensaio de soro neutralização. Há muitos anos já se sabe que o tipo de célula usado pode influenciar o título aparente de um soro, mas ainda não existe um estudo sistemático que mensure o real impacto disso, apesar de um levantamento em 28 laboratórios, algum tempo atrás, ter indicado que pelo menos cinco tipos celulares diferentes são usados nos ensaios de soro neutralização para BVDV (Saliki & Dubovi, 2004).

Independente do sistema de teste usado é necessária muita cautela na interpretação dos resultados sem o contexto do rebanho (exposição prévia documentada, protocolo de imunização, programa de biosegurança, etc.). Quando devidamente aplicada, a sorologia pode ser usada para verificar a eficácia da vacina ou do protocolo de vacinação, verificar se o

rebanho esteve exposto ao BVDV ou para associar o BVDV com os sinais clínicos observados (Saliki & Dubovi, 2004).

#### **2.4.2 Aplicação laboratorial dos métodos de diagnóstico e interpretação dos resultados**

A Diarreia Viral Bovina ainda continua causando prejuízos consideráveis devido à falha em se implementar programas realmente eficazes de imunização, monitoramento do rebanho e biosegurança. E para que esses programas funcionem são necessários testes diagnósticos adequados à realidade das situações. Os laboratórios tem a responsabilidade de oferecer testes que se enquadrem nos programas de manejo dos produtores de sua região. E os profissionais tem a responsabilidade de aprender sobre os testes disponíveis para utilizá-los da melhor maneira possível. Muitas vezes os profissionais escolhem simplesmente o teste mais moderno, sem saber avaliar qual o teste mais adequado à sua necessidade. Os tópicos a seguir trarão alguma orientação para a escolha do método de diagnóstico em determinadas situações clínicas. Mas é preciso ter em mente que nenhum teste irá fornecer a resposta correta sob todas as circunstâncias e que programas de monitoramento são necessários para compensar as falhas nos testes e nos programas de imunização ou biosegurança (Saliki & Dubovi, 2004).

##### *- Manifestação aguda dos sinais clínicos de BVD -*

Quando nos confrontamos com o aparecimento agudo dos sinais clínicos de BVD, a escolha do teste diagnóstico é, em parte, dependente do alcance do problema. Um único animal com sinais agudos da doença pode ser o início da Doença das Mucosas, enquanto vários animais com sinais semelhantes pode significar uma recente introdução do vírus em um rebanho susceptível. Na realidade, a escolha do teste deve cobrir as duas possibilidades, pois inevitavelmente uma estará errada. A seleção do teste e da amostra também depende do animal estar vivo ou morto. O ideal é nunca depender de um único teste para se obter a resposta correta, utilizando sempre que possível, múltiplas amostras para vários tipos de teste (Saliki & Dubovi, 2004).

Para os animais que ainda estão vivos, a melhor amostra para se detectar o vírus costuma ser o sangue total, independentemente do padrão da doença apresentado. Em infecções agudas, vírus detectável permanece nas células mononucleares por duas a três vezes mais tempo que no soro. Para que se consiga detectar o vírus no soro de animais com infecção aguda, a amostra deve ser coletada entre 3 e 8 dias pós infecção. E como raramente se

conhece a data da infecção, este pequeno tempo de viremia torna a coleta de uma boa amostra muito difícil. Swabs de superfícies mucosas também podem ser bons para detectar o BVDV, particularmente no início da infecção, já as fezes nunca devem ser consideradas como amostra primária para BVDV (Saliki & Dubovi, 2004).

A coleta de soro para documentar uma infecção aguda por meio da resposta de anticorpos, deve ser sempre considerada. Um teste ELISA baseado em IgM seria válido usando apenas uma amostra de soro, mas este tipo de teste não é realizado rotineiramente. O uso de amostras pareadas para comparar seus títulos de anticorpos neutralizantes continua sendo o padrão. E a comparação com amostras de companheiros de rebanho não afetados também é recomendada, principalmente se não houver registros de testes anteriores feitos no rebanho (Saliki & Dubovi, 2004).

Se os sinais clínicos estiverem ocorrendo em função da Doença das Mucosas, as recomendações de uso de amostras para animais com a infecção primária aguda também podem ser usadas. Como um verdadeiro caso de Doença das Mucosas só acomete um animal PI, o vírus estará presente em praticamente qualquer amostra coletada. Uma biópsia de pele (ponta de orelha) deve ser coletada de todos os animais afetados, para ajudar a definir o status da doença no animal. Como na grande maioria dos animais com infecção primária aguda não se encontra uma quantidade significativa de antígeno na pele, um teste positivo da biópsia é um forte indicador de que o animal seja PI, e que o BVDV já esteja presente no rebanho a um tempo considerável (Saliki & Dubovi, 2004).

Os abortamentos são uma consequência particularmente problemática da infecção aguda pelo BVDV. Como os abortamentos podem ocorrer várias semanas após a infecção, a coleta de amostras neste momento pode ser improdutiva. Além disso, o abortamento pode ocorrer sem que a mãe ou seus companheiros de rebanho manifestem qualquer sinal evidente de infecção. A decisão de agir deve ser tomada em contexto com o desempenho reprodutivo do rebanho. Um aborto por mês em um rebanho de 250 matrizes não é causa de nenhuma preocupação, já cinco abortos em uma semana exige uma ação eficaz. Amostras de tecido fresco e fixado em formalina devem ser coletadas do feto abortado, juntamente com uma amostra da placenta, para descartar todas as causas de aborto. Também é recomendada amostragem pareada do soro da matriz, e sangue fetal pode ser coletado para determinação da presença de anticorpos. Um perfil do rebanho com os títulos de anticorpos contra BVDV também pode fornecer evidência de infecção ativa (Saliki & Dubovi, 2004).

Em animais mortos é sempre recomendado coletar amostras de tecido, fixadas em formalina e/ou frescas, dos principais sistemas de órgãos. É importante coletar várias amostras de linfonodos e que as amostras de intestino incluam Placas de Peyer. Como discutido anteriormente, uma biópsia de pele deve ser obtida para verificação do status PI (Saliki & Dubovi, 2004).

Vários testes podem ser realizados para detectar uma infecção aguda e até certo ponto, a escolha vai depender dos recursos laboratoriais disponíveis. O RT-PCR pode ser realizado em praticamente qualquer amostra que tenha sido coletada. A validade do teste irá depender da inclusão de controles apropriados para detectar falsos negativos ou falsos positivos. RT-PCR tem a vantagem de ser capaz de detectar o vírus mesmo com a presença de anticorpos neutralizantes, que podem estar presentes nas amostras coletadas em um estágio mais tardio da infecção (Saliki & Dubovi, 2004).

O isolamento viral ainda é o teste padrão. Conseguir-se mais facilmente o isolamento, a partir do sangue total, quando se utiliza células mononucleares isoladas e preferencialmente sem congelamento. O isolamento a partir de tecidos deve ser feito com a compreensão de que anticorpos neutralizantes podem gerar um resultado falso negativo, mesmo que o animal tenha morrido pela infecção pelo BVDV. A melhor maneira de detectar antígenos é usando imunohistoquímica em tecidos fixados em formalina. Alguns autores afirmam que nenhum tecido de ruminante deveria deixar um laboratório de patologia sem uma coloração por imunohistoquímica para BVDV. O uso dos testes ELISA de captura de antígenos licenciados, para detectar animais com infecção aguda é totalmente sem valor. Em muitos casos, o problema básico dos animais que morrem é a infecção persistente pelo BVDV em alguns animais exacerbando outros processos patológicos no rebanho. Se o foco de atenção ficar apenas nos sinais mais evidentes o problema insidioso de BVD passará despercebido (Saliki & Dubovi, 2004).

#### *- Infecção Persistente e Rastreamento do Rebanho -*

Como o animal PI é o elemento chave da manutenção do BVDV no rebanho, todos os programas de controle são altamente dependentes da detecção e eliminação desses portadores do vírus, além de estabelecer medidas para prevenir seu retorno. Uma detecção quase totalmente certa desses animais pode ser feita se os recursos financeiros não forem muito limitantes. Como esses animais representam menos de 1% da população bovina, nenhum esquema de amostragem pode detectá-los mais facilmente que testar todo o rebanho e os

animais nascidos nos próximos 9 meses, já que qualquer feto pode ser PI. Com a bateria de testes disponíveis, existem diversos esquemas que podem ser feitos para o rastreamento do rebanho. Os profissionais devem escolher o teste que melhor se adaptar às práticas de manejo da propriedade. E o esquema escolhido deve ser rigorosamente implementado (Saliki & Dubovi, 2004).

Alguns cenários possíveis são:

1. Coletar sangue total de todos os animais do rebanho. Poderia ser realizado um RT-PCR de cada amostra, mas seria muito caro. O melhor é realizar um RT-PCR em um conjunto de amostras. A quantidade de amostras por teste varia em função da sensibilidade do teste realizado pelo laboratório.

2. Coleta de soro sanguíneo de todos os animais acima de 3 meses de idade, e testar os mais novos quando completarem 3 meses ou com algum teste alternativo. No teste usando soro é preciso saber que os anticorpos colostrais interferem no teste, podendo eliminar o vírus da fração fluida do sangue, por períodos de tempo variados. Mas o vírus nas células mononucleares não é afetado. Os testes que podem ser feitos no soro são: isolamento viral em microplaca, ELISA de captura de antígenos ou RT-PCR.

3. Coletar biópsias de pele (ponta de orelha) de todos os animais do rebanho. Nas biópsias fixadas em formalina deve se utilizar a imunohistoquímica e nas biópsias frescas se utiliza ELISA de captura de antígeno. O uso de tecido fresco dispensa o transporte de formalina, que pode ser problemático devido às regras de remessa de objetos, dependendo do destino.

4. Para uma fazenda leiteira pode ser utilizado conjuntos de amostras de leite das vacas lactantes, e o restante do rebanho ser testado pelos métodos anteriores. As células somáticas do leite são rastreadas para BVDV por RT-PCR ou isolamento viral. É recomendado que o número de vacas representadas em um conjunto de amostras seja menor que 400, embora estudos de diluição indicarem a detecção de um animal PI entre 600.

5. Testar os bezerros pelos métodos 1 ou 3, pouco após o nascimento. Se o produtor tiver registros de reprodução adequados, a determinação do bezerro como não PI automaticamente exclui a possibilidade da mãe ser PI. Dessa maneira a vigilância é mantida com um teste definindo o status de dois animais. Mas é



importante atentar para que o status de todos os animais seja definido (Munoz-Zanzi et al., 2000; Renshaw et al., 2000; Saliki & Dubovi, 2004).

Cada cenário acima tem algumas questões que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Por exemplo, RT-PCR pode detectar BVDV de animais PI, animais com infecção aguda ou vacinados com vírus vivo modificado. O isolamento viral em microplacas pode detectar animais PI e ocasionalmente animais com infecção aguda. A biópsia de pele testada por imunohistoquímica ou ELISA detecta animais PI e muito raramente animais com infecção aguda. Atualmente não há dados para indicar se os testes do leite ou da biópsia de pele podem detectar vírus vivos modificados vacinais. Independentemente do teste utilizado, é recomendado testar novamente os animais positivos, sempre que possível, haja vista não haver teste absolutamente específico para animal PI. Também é necessário lembrar que em raros animais PI mais velhos, pode se desenvolver uma modesta resposta imune, que elimina o vírus da fase fluida do sangue, mas ele ainda pode ser detectado nas células mononucleares (Brock et al., 1998; Saliki & Dubovi, 2004).

## **2.5 Controle e Prevenção**

O controle e a prevenção da BVD só são eficientes quando se dá ênfase às medidas de biossegurança integradas ao manejo da propriedade, levando sempre consideração as características do vírus e do rebanho como o sistema de produção, a fase de criação, a idade, os níveis de stress, o histórico e até os regulamentos governamentais (Lindberg, 2003; Potgieter, 2004). O objetivo principal é eliminar as fontes de vírus (especialmente os animais PI) e quebrar o ciclo de infecção (podendo usar a vacinação) (Bolin, 1995; Roeder & Harkness, 1986). Em rebanhos livres do vírus e não vacinados, as medidas preventivas de biossegurança são muito recomendadas, pois em caso de introdução do vírus as perdas poderão ser muito severas (Potgieter, 2004).

Seguindo-se algum dos métodos de diagnóstico apresentados anteriormente, deve ser definido o status do rebanho. Caso haja evidência da presença do vírus, todo o rebanho deve ser rastreado buscando-se eliminar os animais PI e posteriormente implantar programas de vacinação. Caso o rebanho não tenha tido contato com o vírus pode se optar por não vacinar e

ênfatizar as medidas de biossegurança, como uma quarentena mínima de 30 dias e testes em animais introduzidos, evitar contato com animais ou fômites de outros rebanhos, e certificar-se que doadores de sêmen e embriões sejam livres do vírus, assim como os meios de diluição ou transporte desses produtos (Potgieter, 2004).

Apesar da grande variabilidade genética do BVDV ser um enorme desafio, a vacinação tem obtido resultados interessantes na prevenção da enfermidade clínica, na redução da circulação do vírus e na prevenção da infecção fetal, evitando assim a produção de bezerros PI (Lindberg, 2003).

Uma estratégia para um controle bem feito é a vacinação da fêmea reprodutora pelo menos várias semanas antes do cruzamento, pois a imunidade materna irá proteger os fetos da infecção, mas como a proteção não é total, não se deve abrir mão das medidas de biossegurança (Bolin, 1995; Radostits et al., 2002).

O ideal é que uma vacina combine as mais variadas cepas de BVDV, tanto citopáticas como não-citopáticas, e tanto do genótipo 1 como do genótipo 2, mas como isso não ocorre em grande parte das vacinas comerciais, o grau de reatividade sorológica com as amostras de campo brasileiras é questionável (Vogel et al., 2002).

Existem dois tipos de vacinas. As vacinas de vírus vivo modificado, ou atenuado, não são comercializadas no Brasil. Nessas vacinas o vírus replica-se no animal, tornando necessária uma única vacinação com uma dose pequena para que a imunização seja adequada. Porém são muito instáveis e quaisquer problemas de manipulação ou estocagem (muito comuns no Brasil) causam falha na imunização. Elas também apresentam um risco maior na utilização, pois possuem propriedades imunossupressivas que se manifestam brevemente após a vacinação e podem aumentar a patogenicidade de outros agentes, resultando em doença pós-vacinal. Além do potencial de recombinação genética com outras cepas presentes no hospedeiro, criando uma cepa muito patogênica (Bolin, 1995).

As vacinas inativadas foram desenvolvidas para tentar sanar os problemas de segurança das vacinas com vírus vivo, não apresentando, portanto, infectividade e doença pós-vacinal, sendo segura inclusive para uso em animais prenhes objetivando uma imunidade fetal. Porém são menos eficientes, necessitando de duas doses com intervalo de 2 a 4 semanas para a imunização primária e revacinações mais frequentes, resultando em maior custo (Bolin, 1995; Radostits et al., 2002).

As vacinas contra BVD disponíveis no mercado apresentam respostas sorológicas variadas e são combinadas com outros antígenos, geralmente com o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), o vírus da Parainfluenza (PI-3), o vírus da Doença Respiratória Sincicial Bovina (BRS) e às vezes Leptospirose. Sendo necessário seguir corretamente as doses e intervalos de reforço indicados pelos fabricantes.

É necessário ressaltar que a vacina age em conjunto com o sistema imunológico do animal, o que nos faz levar em consideração seu estado nutricional, bem estar e condição sanitária. E apesar de todo o conjunto de medidas possíveis o controle ainda é considerado parcial, sendo difícil já pensar na erradicação antes do desenvolvimento de novas estratégias mais eficazes.

### **3 Relato de Casos**

#### **3.1 1º Caso**

No dia 09/02/2011 os veterinários do Hospital Escola de Grandes Animais da UnB foram chamados para prestar atendimento em uma propriedade, no distrito de São Gabriel de Goiás, município de Planaltina - GO, onde quatro novilhos da raça Brangus, de aproximadamente 9 meses de idade, que haviam estado em confinamento, há 10 dias apresentavam sinais de fraqueza, diarreia, perda de apetite, pelos eriçados, sons pulmonares e traqueais ásperos e alguns apresentavam úlceras na mucosa oral. O proprietário informou que cinco animais do mesmo lote já haviam morrido e que alguns animais do confinamento apresentaram pneumonia.

Os animais eram vacinados contra Botulismo e já haviam sido tratados por outro veterinário com Oxitetraciclina (antibiótico de amplo espectro), Ganaseg® (Diaceturato de diminazene – quimioterápico contra babesiose e tripanossomíase) e Mercepton® (associação de agentes com ação hepatoprotetora e imunoestimulante), mas não apresentaram melhora.

Os animais foram avaliados no local e um deles foi encaminhado ao Hospital Veterinário para a realização de necropsia. Este apresentou as seguintes alterações no exame clínico: comportamento deprimido, marcha rígida, pelos eriçados e hipotricose na região da cernelha e dorso, presença moderada de carrapatos, vasos episclerais levemente ingurgitados, mucosas hiperêmicas, um pouco de secreção mucosa na fossa nasal, miose responsiva a luz, auscultação traqueal áspera, rúmen com pouca intensidade nos movimentos e predominância de conteúdo líquido.

Figura 1 – Lesão na mucosa oral de um dos novilhos do lote do 1º Caso.



Fonte: HVet – UnB.

Figura 2 – Lesões na face inferior da língua de um dos novilhos do lote do 1º Caso.



Fonte: HVet – UnB.

Figura 3 – Aspecto da diarreia de um dos novilhos do lote do 1º Caso.



Fonte HVet – UnB.

Os exames coproparasitológicos dos animais revelaram infecção leve por nematoides da superfamília Strongyloidea, mas sem relevância para o caso. O hemograma e análise bioquímica são mostrados a seguir:

Tabela 1 - Análise sanguínea do animal do 1º caso.

Parâmetros		Valores de Referência*	Animal em 10/02/2011
VG (%)		26 - 46	22 ↓
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> /μl)		5 - 10	4,44 ↓
Hemoglobina (g/dl)		8 - 15	5,6 ↓
VCM (fl)		40 - 60	49,5
CHCM (%)		26 - 36	25,45 ↓
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)		4 - 12	12,5 ↑
Segmentados	Absolutos (/μl)	600 - 5.400	6.750 ↑
	Relativos (%)	15 - 45	54 ↑
Linfócitos	Absolutos (/μl)	1.800 - 9.000	5.000
	Relativos (%)	45 - 75	40 ↓
Monócitos	Absolutos (/μl)	80 - 840	750
	Relativos (%)	2 - 7	6
PPT (g/dl)		7 - 8,5	5,9 ↓
Albumina (g/dl)		3 - 3,6	1,6 ↓
Fibrinogênio (mg/dl)		300 - 700	800 ↑
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /ml)		200 - 800	649
Ureia (mg/dl)		42 - 64	45
Creatinina (mg/dl)		1 - 2	0,8 ↓
AST (UI/L)		78 - 132	246 ↑
CPK (UI/L)		66 - 120	48 ↓

\* Fonte: Rosenberger (1993); ↑ Valor acima do valor de referência; ↓ Valor abaixo do valor de referência.

O exame revelou anemia normocítica hipocrômica, provavelmente causada pela diarreia e falta de apetite, com carência de ferro. A leucocitose por neutrofilia, havendo a inversão de relação neutrófilos/linfócitos, e aumento do fibrinogênio indicam processo inflamatório moderado, crônico. A hipoproteinemia e hipoalbuminemia se desenvolvem em função da diarreia e falta de apetite.

O animal foi eutanasiado e necropsiado às 9 horas e 30 minutos do dia 11/02/2012, apresentando os seguintes achados macroscópicos: os lobos craniais e a porção ventral dos pulmões apresentavam coloração avermelhada. Havia dois nódulos com cerca de 9 cm de diâmetro localizados na pleura, próximos ao lobo acessório do pulmão direito. Estes nódulos tinham cápsula espessa e conteúdo purulento (aproximadamente 100 ml de material líquido amarelado – pus – em cada nódulo). Na cápsula do fígado havia um foco de retração (fibrose), de aproximadamente 2 x 2 cm, com coloração esbranquiçada. No coração havia material gelatinoso, de coloração amarelada (atrofia gelatinosa) na região da base dos grandes vasos. Na porção torácica da aorta havia área de 3 x 4 cm com enrugamento da parede do vaso. No jejuno havia parasitas milimétricos, de 0,2 x 0,05 cm, aderidos de forma multifocal nas placas de Peyer, que se encontravam evidentes e elevadas, com coloração esbranquiçada. Por toda extensão do íleo, até o óstio ileocecólico, havia enrugamento da mucosa. Havia ainda espessamento e evidência dos vasos linfáticos mesentéricos e aumento de volume dos linfonodos mesentéricos com áreas hemorrágicas no parênquima.

Figura 4 – Abscessos próximos ao lobo acessório do pulmão direito no animal do 1º Caso.



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.

Figura 5 – Conteúdo dos abscessos no animal do 1º Caso.



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.

Figura 6 – Áreas hemorrágicas no linfonodo mesentérico no animal do 1º Caso.



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.



Os principais achados microscópicos foram: **Sistema nervoso central e periférico:** observou-se em neurônios do córtex frontal, córtex parietal, cápsula interna, córtex temporal, tálamo, córtex occipital, colículos rostral e caudal, ponte e pedúnculos, cerebelo, óbex, medula cervical, medula torácica e gânglio trigeminal, discretas inclusões intracitoplasmáticas, únicas a múltiplas, eosinofílicas, com tamanho variando entre 6 e 10 micrômetros (corpúsculos de Negri), distribuídas multifocalmente, característico de Raiva. **Intestino delgado e grosso:** observou-se áreas multifocais de fusão e perda moderada de vilosidade e dilatação das criptas intestinais, com perda e adelgaçamento de revestimento epitelial. No interior destas criptas havia quantidade abundante de neutrófilos degenerados, debris celulares discretamente basofílicos, linfócitos, macrófagos e material amorfo, eosinofílico, discretamente granuloso (necrose), com discretos focos de calcificação no centro. Estas áreas de necrose se localizavam principalmente próximas às placas de Peyer, que esporadicamente apresentavam áreas necróticas. Havia ainda, discreto a moderado infiltrado linfocítico, causando expansão na lâmina própria, discreta proeminência de vasos linfáticos nas vilosidades (linfangiectasia) e discreto edema na submucosa. **Pulmão:** observou-se espessamento acentuado de septos interalveolares, devido a acentuado infiltrado neutrofílico, moderado de linfócitos e histiócitos. Havia áreas multifocais com perda de arquitetura, presença de fibroblastos e deposição de fibras colágenas na parede de alvéolos. Foi observada uma frouxidão de tecido conjuntivo nos septos interlobulares (edema) e moderado rompimento de alvéolos, com presença de bordas em clava em alguns septos interalveolares (enfisema). Na região peribronquiolar havia discreta hipertrofia da musculatura lisa, associada a discreto infiltrado de linfócitos, distribuídos multifocalmente, De forma discreta, observou-se grânulos acastanhados no interior de macrófagos (hemossiderose) e congestão difusa. Concluindo-se que havia broncopneumonia supurativa, crônica, multifocal a coalescente, moderada, e pleuropneumonia abscedativa, focal, moderada. **Linfonodos:** havia áreas com rarefação celular em folículos linfóides e presença acentuada de material granular acastanhado (hemossiderose) distribuído multifocalmente no parênquima.

As lesões intestinais, com necrose de criptas próximas às placas de Peyer, são características de BVD e a broncopneumonia crônica secundária é muito comum em animais com BVD devido à imunossupressão causada pelo vírus. A presença do BVDV foi posteriormente confirmada através de imunohistoquímica realizada no Laboratório de Patologia Veterinária da UnB. O animal apresentou também o quadro histopatológico característico da Raiva (corpúsculos de Negri em neurônios).

### 3.2 2º Caso

No dia 17/07/2012, os veterinários do Hospital Escola de Grandes Animais da UnB foram chamados para prestar atendimento em uma propriedade próxima ao km 32 da rodovia DF-250, no Distrito Federal, a uma fêmea bovina da raça Gir, de aproximadamente 5 anos de idade. O tratador relatou que o animal pariu um bezerro natimorto no dia 14/07/2012 e que ingeriu a placenta, apresentando apatia e apetite caprichoso no dia seguinte, e que administrou 15 ml de Banamine® (Flunixin meglumine). O proprietário relatou que o dia previsto para o parto era 10/07/2012, que o animal havia sido casqueado no dia 13/07/2012 e que era vacinado contra Febre Aftosa, Brucelose, Raiva, Botulismo e Tétano.

Durante o exame clínico, as alterações registradas pelos veterinários foram: turgor da pele diminuído, linfonodos pré-escapulares aumentados, rúmen apresentando motricidade e intensidade de movimentos diminuídas e conteúdo compactado, fezes firmes, de cor castanha, com odor pútrido e presença de muco e urina concentrada.

O animal foi tratado com 20 litros de fluidoterapia parenteral, 1 litro de Hertavita® (complexo vitamínico), 7 litros de fluidoterapia enteral com Organew® (suplemento proteico com prebióticos e probióticos) e 6 litros de líquido ruminal de um animal saudável. Porém, o animal faleceu na madrugada do dia 18/07/2012 e foi realizada a necropsia às 10h45min do mesmo dia.

O laudo Anatomopatológico apresentou os seguintes resultados:

Descrição Macroscópica: A carcaça apresentava escore corporal 3 (escala de 1 a 5) e mínima autólise. A mucosa vulvar estava hiperêmica. Na gengiva direita ventral observou-se uma lesão erosiva arredondada, bem delimitada, amarelada no centro e avermelhada na periferia. Na região abdominal direita havia uma área de hematoma de aproximadamente 8 cm. de diâmetro. Ao abrir a cavidade abdominal, visualizou-se cerca de 8 L. de um líquido amarronzado com conteúdo fecal. Os órgãos da cavidade abdominal apresentavam grande quantidade de fibrina em sua superfície. O omento e o peritônio estavam severamente edemaciados e congestos. Na porção final do duodeno e início do jejuno havia algumas áreas de úlcera perfurante, arredondadas, variando de 0,5 cm. a 1,0 cm. de diâmetro que perfuravam a parede do órgão. As bordas dessas lesões eram acastanhadas contendo grande quantidade de

fibrina. Na mucosa do jejuno haviam múltiplas úlceras, que variavam de 0,5 cm. a 2 cm. de diâmetro, arredondadas ou ovaladas e de coloração acastanhada. A mucosa do intestino delgado estava difusamente avermelhada. No abomaso observou-se algumas úlceras que mediam aproximadamente 0,5 cm. de diâmetro com a mucosa difusamente avermelhada. Na superfície do ventrículo esquerdo observou-se algumas petéquias tanto na base como no ápice. O fígado apresentava-se discretamente aumentado. No interior do útero havia aproximadamente 500 ml. de um líquido amarronzado. A bexiga estava edemaciada com a mucosa difusamente avermelhada. O encéfalo estava discretamente hiperêmico.

Figura 7 – Lesão na mucosa oral do animal do 2º Caso.



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.

Figura 8 – Conteúdo intestinal na cavidade abdominal do animal do 2º Caso



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.

Figura 9 – Úlceras perforantes no intestino do animal do 2º Caso.



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.

Figura 10 – Úlceras na mucosa do abomaso do animal do 2º Caso.



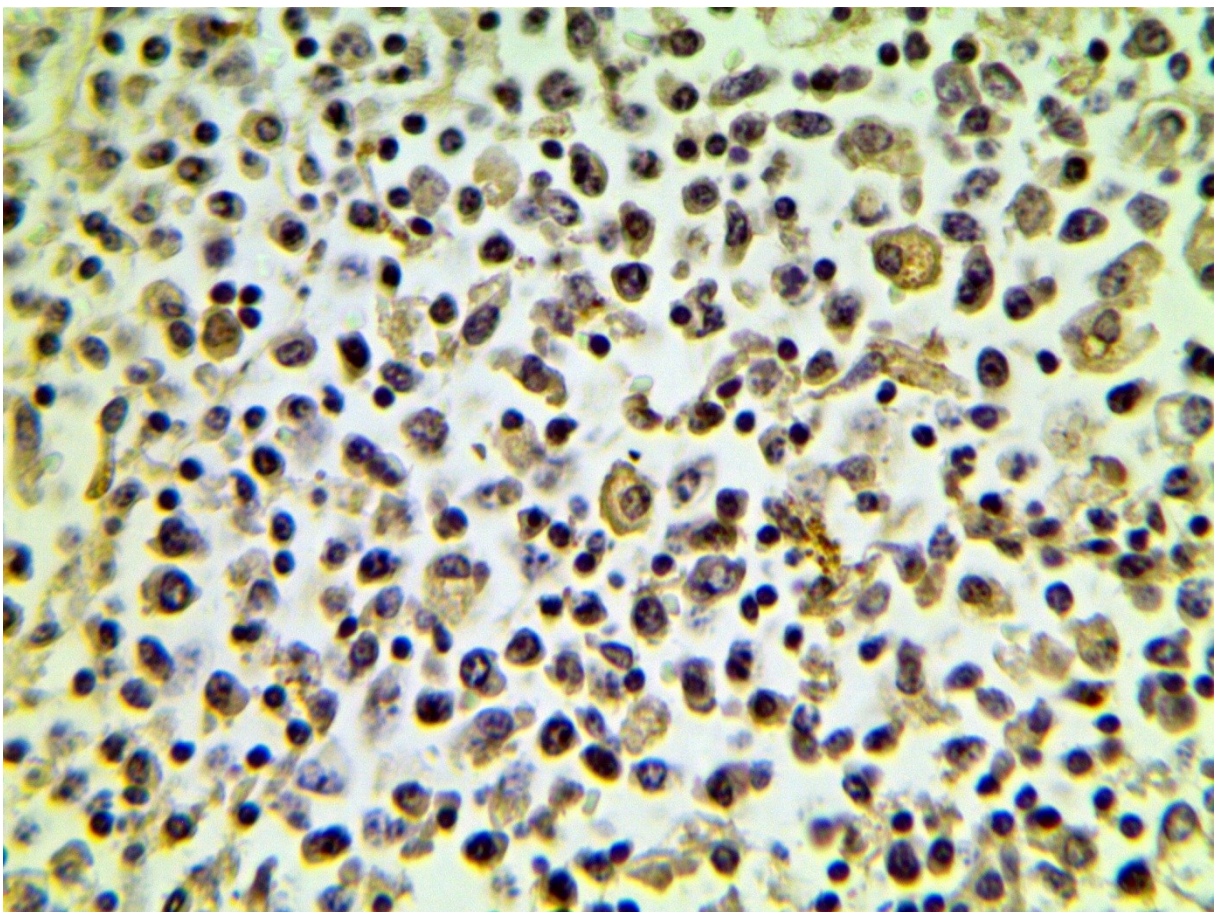
Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.

Descrição microscópica: **Intestino delgado:** Observa-se perda, atrofia e fusão das vilosidades com necrose das glândulas intestinais. Há infiltrado inflamatório difuso, se estendendo da mucosa a serosa, constituído por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, estes geralmente degenerados e, em menor quantidade, macrófagos. A submucosa apresenta-se acentuadamente edemaciada e com grande quantidade de fibrina, entremeando o infiltrado inflamatório, alguns trombos vasculares e múltiplos focos de necrose pouco delimitados. A serosa apresenta áreas multifocais de necrose com miríades de bactéria intralesionais. Há hemorragia multifocal moderada na submucosa e na camada muscular e congestão difusa. Resultando em enterite necrosupurativa aguda difusa e ulcerativa multifocal acentuada e peritonite fibrinopurulenta aguda difusa acentuada. **Intestino grosso:** A mucosa apresenta moderadas áreas de necrose pouco delimitadas, enquanto na serosa há extensas áreas multifocais de necrose com várias colônias bacterianas em meio a neutrófilos íntegros e degenerados. Resultando em colite necrotizante neutrofílica aguda multifocal acentuada. **Linfonodo mesentérico:** Há necrose de folículo linfoide com áreas multifocais bem delimitadas de fibrina e grande quantidade de histiócitos, algumas células gigantes e macrófagos epitelióide. Visualiza-se edema difuso. Resultando em linfadenite granulomatosa

difusa. **Rúmen e retículo:** Na serosa há moderada quantidade de colônias bacterianas com infiltrado difuso discreto de neutrófilos íntegros e degenerados. Resultando em serosite neutrofílica difusa moderada. **Bexiga:** Observa-se congestão difusa e em alguns vasos sanguíneos da camada muscular e serosa há muitos neutrófilos, macrófagos e alguns linfócitos. Na serosa visualiza-se acentuado edema difuso e moderada necrose multifocal a coalescente com presença de colônias bacterianas. Resultando em serosite necrotizante neutrofílica difusa acentuada com severo edema e colônias bacterianas intralesionais. **Rim:** No interstício do córtex renal há discreto infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e histiócitos. Observa-se congestão difusa localizada principalmente na região cortico-medular. Resultando em nefrite intersticial linfoplasmocítica multifocal discreta.

Foi realizada coloração por imunohistoquímica no linfonodo mesentérico e o resultado foi positivo para presença do vírus da Diarreia Viral Bovina, o que muito provavelmente é a causa do bezerro natimorto e das lesões ulcerativas na gengiva, abomaso e intestinos.

Figura 11 – Coloração imunohistoquímica positiva para BVD no linfonodo mesentérico do animal do 2º Caso,



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – UnB.

### 3.3 3º Caso

No dia 21/07/2012 o proprietário procurou atendimento no Hospital Escola de Grandes Animais da UnB, trazendo uma bezerra mestiça, cruzamento entre Canchim e Nelore, com idade entre 8 e 9 meses que apresenta histórico de diarreias recorrentes desde os 4 meses de idade. Após o desmame, cerca de dois meses atrás, a diarreia apresentou piora, sendo as fezes de coloração verde oliva e sem odor fétido. O animal já foi tratado por veterinários, mas não apresentou melhora e o proprietário não soube informar quais medicamentos foram utilizados.

Recentemente a bezerra foi vacinada contra Brucelose e recebeu vermifugação com Ivermectina 1% (volumes de 1,5 depois 3,5 ml.). Ela fica em pasto de Brachiaria e não é alimentada com ração ou qualquer outro alimento concentrado. A propriedade, que possui cerca de 140 bovinos de corte entre Canchim e Nelore, passou por um surto de diarreia em bezerros lactentes no ano passado, mas não apresentou óbitos.

Ao exame clínico, as seguintes alterações foram observadas: pelos eriçados e foscos, turgor de pele levemente deficiente, fossa nasal seca, mucosas com fundo icterico, linfonodos pré-escapulares e pré-crurais aumentados, auscultação traqueal levemente áspera, rúmen com motricidade e intensidade de movimentos diminuídas e pouco conteúdo sem estratificação evidente, havendo a predominância de líquido. As fezes observadas foram em pouca quantidade, de coloração verde oliva, possuindo odor característico e consistência pastosa, com o animal apresentando um forte tenesmo.

Figura 12 – Diarreia e tenesmo no animal do 3º Caso.



Fonte: HVet – UnB.

A seguir são apresentados os resultados dos hemogramas e análises bioquímicas do sangue, realizados no animal:

Tabela 2 - Hemogramas realizados no animal do 3º caso.

Parâmetros		Valores de Referência*	Animal em 23/07/2012	Animal em 15/08/2012	Animal em 16/08/2012
VG (%)		26 - 46	40	39	32
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> /μl)		5 - 10	10,5	10,36	8,1
Hemoglobina (g/dl)		8 - 15	12,1	12,1	10
VCM (fl)		40 - 60	38	37,6	39,5
CHCM (%)		26 - 36	30,2	31	31,25
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)		4 - 12	13,7 ↑	12,3	8,5
Bastonetes	Absolutos (/μl)	0 - 240	137	123	-
	Relativos (%)	0 - 2	1	1	-
Segmentados	Absolutos (/μl)	600 - 5.400	1.507	3.444	4.590
	Relativos (%)	15 - 45	11 ↓	28	54 ↑
Linfócitos	Absolutos (/μl)	1.800 - 9.000	10.001 ↑	8.487	3.740
	Relativos (%)	45 - 75	73	69	44 ↓
Monócitos	Absolutos (/μl)	80 - 840	685	246	170
	Relativos (%)	2 - 7	5	2	2
Eosinófilos	Absolutos (/μl)	80 - 2.400	1.370	-	-
	Relativos (%)	2 - 20	10	-	-

\* Fonte: Rosenberger (1993); ↑ Valor acima do valor de referência; ↓ Valor abaixo do valor de referência.



Tabela 3 - Análises bioquímicas do sangue do animal do 3º caso.

Parâmetros	Valores de Referência*	Animal em 23/07/2012	Animal em 15/08/2012	Animal em 16/08/2012
PPT (g/dl)	7 - 8,5	4,7 ↓	7,1	4,7 ↓
Albumina (g/dl)	3 - 3,6	1,8 ↓	1,8 ↓	1,7 ↓
Globulina (g/dl)	3 - 3,5	2,9	-	3
Fibrinogênio (mg/dl)	300 - 700	600	1.200 ↑	1.200 ↑
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /ml)	200 - 800	302	317	1.388 ↑
Ureia (mg/dl)	42 - 64	14 ↓	72 ↑	29 ↓
Creatinina (mg/dl)	1 - 2	1,1	1,2	0,4 ↓
AST (UI/L)	78 - 132	89	94	209 ↑
CPK (UI/L)	66 - 120	170	777 ↑	2.598 ↑

\* Fonte: Rosenberger (1993); ↑ Valor acima do valor de referência; ↓ Valor abaixo do valor de referência.

O exame do dia 23/07/2012 revelou discreta leucocitose por linfocitose com neutropenia relativa, indicando leve processo inflamatório, além de hipoproteinemia, hipoalbuminemia e hipouremia, que são indicativas de carência nutricional, problemas no trato gastrointestinal ou insuficiência hepática.

A suspeita inicial foi Coccidiose. O exame coproparasitológico do dia 23/07/2012 apresentou resultado negativo, o que não confirma, mas também não é suficiente para descartar a suspeita.

Optou-se pelo tratamento com Sulfaquinoxalina (12 mg/kg), via oral, SID, durante 5 dias (de 23/07 a 27/07), mas o animal não respondeu ao tratamento. Nos dias 10, 11 e 12/08/2012 foram administrados 2,2 mg/kg de Flunixin Meglumine, IM, SID. E o tratamento com Sulfaquinoxalina foi repetido entre os dias 17 e 21/08/2012.

O quadro foi apresentando constante piora durante o período de internação, com breves momentos de melhora quando o animal recebia tratamento suporte como hidratação enteral e transfaunação. Os exames sanguíneos do dia 16/08/2012 demonstraram que a reação inflamatória se intensificou, havendo a inversão na relação neutrófilos/linfócitos e aumento do fibrinogênio. Os baixos índices de proteinemia se mantiveram e o aumento da CPK se justifica pela lesão muscular resultante do constante decúbito do animal.

Devido à ausência de resposta aos tratamentos e com a constatação da presença de lesões ulcerativas na mucosa oral, a principal suspeita tornou-se BVD. Foram então

encaminhadas biópsias da mucosa oral e da ponta da orelha para o Laboratório de Patologia Veterinária da UnB, mas os resultados foram negativos para presença do vírus.

Figura 12 – Lesão na mucosa oral do animal do 3º Caso.



Fonte: HVet – UnB.

Figura 13 – Lesões na mucosa oral do animal do 3º Caso.



Fonte: HVet – UnB.

O animal foi a óbito na madrugada do dia 12/09/2012 e a necropsia foi realizada no mesmo dia às 10:00 horas, apresentando os seguintes achados macroscópicos: A mucosa oral, conjuntival e vulvar estavam discretamente pálidas. Na mucosa da gengiva superior haviam duas úlceras bem circunscritas medindo 1 e 0,5 cm de diâmetro, de coloração amarelada e bordos irregulares. No terço final da língua observou-se área ulcerada focalmente extensa, de aproximadamente 5 x 2 cm, de coloração avermelhada. O subcutâneo da região do pescoço, esterno e crista ilíaca apresentava aspecto gelatinoso e translúcido. No membro torácico direito havia lesão ulcerada, arredondada, com crostas avermelhadas de 3 cm de diâmetro. A maioria dos linfonodos estava com centro de aspecto granulomatoso, sendo que os linfonodos mesentéricos também apresentavam aumento de tamanho, e ao corte notou-se nodulações milimétricas proeminentes, difusamente distribuídas e de coloração esbranquiçada. No fígado havia áreas multifocais de coloração amarelada que variavam de 5 a 8 cm de diâmetro e que se aprofundavam ao corte. No intestino, na porção do íleo, foram vistas áreas avermelhadas milimétricas na mucosa e congestão difusa.

Após as análises microscópicas se obteve os seguintes diagnósticos morfológicos: **Pulmão:** Pneumonia linfocítica e supurativa multifocal discreta com edema moderado. **Coração:** Hemorragia multifocal a coalescente, discreta, com múltiplas estruturas compatíveis com *Sarcocystis* spp. **Fígado:** Hepatite e colangite linfoplasmocítica multifocal discreta. **Baço:** Necrose centro folicular multifocal discreta. **Rúmen:** Rumenite linfocítica multifocal discreta. **Intestino:** Enterite linfocítica difusa moderada, com hiperplasia linfoide acentuada. **Linfonodos:** Hiperplasia linfoide e edema acentuado. **Tonsila:** Necrose focalmente extensa, moderada. **Medula óssea:** Hipoplasia de medula e linfocitose. **Lábio:** Queilite linfo-histiocítica multifocal moderada. **Língua:** Glossite ulcerativa e necrotizante linfo-histiocítica multifocal moderada, com múltiplas estruturas compatíveis com *Sarcocystis* spp. **Orelha:** Dermatite necrotizante linfo-histiocítica e neutrofilica focalmente extensa moderada.

As lesões encontradas não são específicas e podem ser uma resposta imunológica a um agente qualquer, portanto, mesmo em conjunto com a anamnese, dados epidemiológicos, sinais clínicos e exames complementares realizados, não foi obtido um diagnóstico conclusivo para este caso.

### 3.4 Discussão sobre os casos clínicos

No caso dos novilhos Brangus (1º Caso), vários sinais clínicos apresentados são sugestivos de BVD e condizem com a literatura (Baker, 1995; Carman et al. 1998; Potgieter em 2004, Radostits et al.; 2007) A diarreia aquosa, com alta morbidade e não responsiva ao tratamento, fraqueza e inapetência são citados por praticamente todos os autores que descrevem os sinais clínicos da doença. As ulcerações na língua e mucosa oral, que não estavam presentes no animal necropsiado, mas sim nos seus companheiros de rebanho, também são achados frequentes nos casos de BVD.

A presença concomitante de doença respiratória no 1º caso, que na anamnese foi relatada em outros animais do rebanho e encontrada na necropsia do animal, também é amplamente discutida na literatura. Segundo Potgieter (2004), o papel primário do BVDV nas doenças respiratórias é o de facilitar as infecções secundárias ao interferir na resposta imune do animal. Além disso, ele prejudica a eliminação de bactérias do trato respiratório e promove a disseminação de bactérias nas vias respiratórias inferiores. Segundo Welsh et al. (1995), o vírus se replica dentro dos macrófagos alveolares e destroem ou prejudicam a função destas células, que tem papel fundamental na defesa dos pulmões contra os microrganismos. Turk et al. (1985 *apud* Potgieter 2004) demonstraram que bezerros infectados pelo BVDV possuem números reduzidos de linfócitos e neutrófilos pulmonares, quantificando as células em lavados bronco-alveolares. De acordo com Ridpath (2010), a interação do BVDV com agentes bacterianos como *Mycoplasma bovis* e *Mannheimia haemolytica* resulta em aumento na patogenicidade e cronificação da infecção, e na interação com agentes virais como o vírus da Doença Respiratória Sincicial, o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa e o vírus da Parainfluenza-3, resulta em aumento da patogenicidade e maior disseminação destas doenças.

Já a leucopenia, que normalmente ocorre (Baker, 1995; Carman et al. 1998; Potgieter em 2004, Radostits et al.; 2007), não foi observada no 1º caso. Foi observada uma discreta leucocitose por aumento de leucócitos segmentados, compatível com infecção.

Os achados anatomopatológicos, do animal necropsiado no 1º caso, no intestino, linfonodos e pulmões, também coincidem com as lesões descritas na literatura. A reação inflamatória do intestino, apresentando necrose das criptas, principalmente sobre as placas de Peyer, as áreas hemorrágicas nos linfonodos e depleção do tecido linfoide são descritos por

Potgieter (2004). Ele afirma que as lesões patológicas básicas são sempre semelhantes, mas variam muito no grau em que se manifestam em cada animal, sendo influenciadas pelo isolado viral e pela resistência do indivíduo. Já as lesões pulmonares variam em função do agente secundário envolvido, podendo apresentar desde apenas pneumonia intersticial mononuclear, com hemorragia e necrose do epitélio alveolar até pleuropneumonia severa com muita fibrina e supuração.

A vaca Gir do 2º caso apresentou as lesões ulcerativas, amplamente descritas na literatura (Baker, 1995; Carman et al. 1998; Potgieter em 2004, Radostits et al.; 2007), em diversos segmentos do trato digestório, desde a cavidade oral, passando pelo abomaso e intestinos. A causa mortis pode ser atribuída às úlceras perfurantes do duodeno e jejuno, que resultaram em extensa peritonite e septicemia. Os achados microscópicos também são condizentes com os descritos por Potgieter (2004), no que se refere à degeneração e necrose das criptas intestinais com infiltrado difuso e também à necrose de folículos linfóides nos linfonodos.

O bezerro natimorto do 2º caso não foi observado pelos veterinários para que se avaliasse a sua real condição, que poderia ser expulsão fetal ou mumificação, pois segundo Done et al. (1980), o BVDV pode causar a morte fetal em qualquer momento da gestação, mesmo sendo mais comum no terço inicial e segundo Murray (1991), a expulsão do feto pode ocorrer até 50 dias após sua morte.

Já a bezerra mestiça Canchim/Nelore do 3º caso se tornou suspeita de BVD pela diarreia intermitente não responsiva aos tratamentos e presença de lesões ulcerativas na mucosa oral. Mas foi negativa em testes para presença do vírus no sangue e na pele. De fato seus hemogramas não apresentaram a leucopenia causada pelo BVDV relatada na literatura (Baker, 1995; Carman et al. 1998; Potgieter em 2004, Radostits et al.; 2007), e na necropsia seus linfonodos apresentavam hiperplasia ao invés da depleção do tecido linfóide característica da infecção pelo vírus da BVD. Os outros achados são inespecíficos e portanto não se chegou a um diagnóstico conclusivo para seu caso.

## 4 Conclusão

Entre as diversas doenças que afetam os bovinos, a Diarreia Viral Bovina é uma das mais insidiosas e causa grande prejuízo a toda a cadeia produtiva, mas é muito difícil mensurar exatamente o tamanho deste prejuízo. A enorme diversidade ou até mesmo ausência de manifestações clínicas e sintomatologia, a grande variabilidade antigênica do vírus e a pobre estrutura de suporte ao diagnóstico existente no país, representam um grande desafio aos médicos veterinários, produtores rurais e autoridades sanitárias do Brasil.

Apesar das dificuldades, o conhecimento sobre o vírus e sobre as diversas formas da doença vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, permitindo melhorias nas estratégias e ferramentas de combate e prevenção. Isto é algo que proporciona uma boa perspectiva de melhoria da saúde e rentabilidade dos rebanhos, mas ainda estamos longe de poder pensar na erradicação.

Os dois casos confirmados pelo Hospital Escola de Grandes Animais da UnB, um em 2011 e o outro em 2012, demonstram que o vírus está presente no Distrito Federal e entorno, e que os produtores rurais e principalmente os veterinários devem ficar mais atentos a esta doença, integrando os métodos preventivos às práticas de manejo adotadas nas propriedades.

## 5 Referências Bibliográficas

Adler, B.; Adler, H.; Pfister, H.; Jungi, T.W.; Peterhans, E. Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. **Journal of Virology**, 1997, 71, p.3255-3258.

Alves, D.; McEwen, B.; Hazlett, M.; Maxie, G.; Anderson, N. Trends in bovine abortions submitted to the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 1993–1995. **Can Vet J**, 1996, 37, p.287–288.

Anderson, M.; Blanchard, P.; Barr, C.; Hoffman, R. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. **J Vet Diagn Invest**, 1990, 2, p.283–287.

Archbald, L.F.; Gibson, C.D.; Schultz, R.H.; Fahning, M.L.; Zemjanis, R. Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows. **Am J Vet Res**, 1973, 34, p.1133–1137.

Archbald, L.; Fulton, R.; Seger, C.; Al-Bagdadi, F.; Godke, R. Effect of the bovine viral diarrhoea virus on preimplantation embryos: a preliminary study. **Theriogenology**, 1979, 11, p.81–9.

Atluru, D.; Notowidjojo, W.; Johnson, D.W.; Muscoplat, C.C. Suppression of in vitro immunoglobulin biosynthesis in bovine spleen cells by bovine viral diarrhoea virus. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 1979, 13, p.254-260.

Atluru, D.; Xue, W.; Polam, S.; Atluru, S.; Blecha, F.; Minocha, H.C. In vitro interactions of cytokines and bovine viral diarrhoea virus in phytohemagglutinin-stimulated bovine mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 1990, 25, p.47-59.

Badman, R.; Mitchell, G.; Jones, R.; Westbury, H. Association of bovine viral diarrhoea virus infection to hydrancephaly and other central nervous system lesions in perinatal calves. **Aust Vet J**, 1981, 57, p.306–307.

Baker, J.; York, C.J.; Gillespie, J. Mitchell G. Virus diarrhoea in cattle. **Am J Vet Res**, 1954, 15, p.525–531.

Baker, J.C. Bovine viral diarrhoea virus: a review. **J Am Vet Med Assoc**, 1987, 190, p.1449–1458.

Baker, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Vet Clin North America**, 1995, 11, p.425–445.

Bielanski, A.; Hare, W.C. Effect in vitro of bovine viral diarrhoea virus on bovine embryos with the zona pellucida intact, damaged and removed. **Vet Res Commun**, 1988, 12, p.19–24.

Bielanski, A.; Loewen, K.; DelCampo, M.; Sirard, M.; Willadsen, S. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea (BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, 1993, 40, p.531–538.

Bielefeldt-Ohmann, H. An ocular-cerebellar syndrome caused by congenital viral diarrhoea virus-infection. **Acta Vet Scand**, 1984, 25, p.36–49.

Binkhorst, G.; Fournie, D.; Wouda, W.; Straver, P.; Vos, J. Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infection with bovine virus diarrhoea virus. **Vet Q**, 1983, 5, p.145–155.

Bohac, J.G.; Yates, W.D.G. Concurrent bovine virus diarrhoea and bovine papular stomatitis infection in a calf. **Canadian Veterinary Journal**, 1980, 21, p.310-313.

Bolin, S.R.; McClurkin, A.W.; Coria, M.F. Effects of bovine viral diarrhoea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T Lymphocytes in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, 1985, 46, p.884-886.

Bolin, S.R. The pathogenesis of mucosal disease. **Veterinary Clinics of North America**, 1995, 11, p.489-500.

Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2013.

Braun, R.K.; Osburn, B.I.; Kendrick, J.W. Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. **Am J Vet Res**, 1973, 34, p.1127–1132.

Brito, W.M.E.D.; Alfaia, B.T.; Caixeta, S.P.M.B.; Ribeiro, A.C.C.; Miranda, T.M.T.; Barbosa, A.C.V.C.; Barthasson, D.L.; Linhares, D.C.; Faria, B.O. Serological study on bovine viral diarrhoea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. **Virus Rev. Res.**, 2002, 7(1), p.144.

Brock, K.; Stringfellow, D. Comparative effects of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea on bovine blastocysts. **Theriogenology**, 1993, 39, p.196.

Brock, K.V.; Grooms, D.L.; Ridpath, J.; Bolin, S.R. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 1998, 10, p.22-26.

Brock, K.V.; Chase, C.C. Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **Vet Microbiol**, 2000, 77, p.209–214.

Brock, K.; Cortese, V. Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhoea virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. **Vet Ther**, 2001, 2, p.354-360.

Brown, T.T.; Bistner, S.I.; de Lahunta, A.; Scott, F.W.; McEntee, K. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. II. Ocular lesions. **Vet Pathol**, 1975, 12, p.394–404.



Brown, G.B.; Bolin, S.R.; Frank, D.E.; Roth, J.A. Defective function of leukocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, and the influence of recombinant cytokines. **American Journal of Veterinary Research**, 1991, 52, p.381-387.

Brownlie, J.; Clarke, M.C.; Howard, C.J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Res Vet Sci**, 1989, 46, p.307-311.

Brun-Hansen, H.; Christensson, D.A.; Eide, D.M.; Gronstol, H. Experimental infection with babesia divergens in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, 1988, 45, p.269-277.

Canal, C.W.; Strasser, M.; Hertig, C.; Masuda, A.; Peterhans, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Vet. Microbiol.**, 1998, 63, p.85-97.

Carman, S.; van Dreumel, T.; Ridpath, J.; Hazlett, M.; Alves, D.; Dubovi, E.; et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. **J Vet Diagn Invest**, 1998, 10, p.27-35.

Casaro, A.P.; Kendrick, J.W.; Kennedy, P.C. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. **Am J Vet Res**, 1971, 32, p.1543-1562.

Castrucci, G.; Frigeri, F.; Osburn, B.I.; Ferrari, M.; Sawyer, M.M.; Aldrovandi, V. A study of some pathogenetic aspects of bovine viral diarrhoea virus infection. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 1990, 13, p.41-49.

Chaves, N.P.; Bezerra, D.C.; Sousa, V.E.; Santos, H.P.; Pereira, H.M. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarréia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense. **Brasil. Cienc. Rur.**, 2010, 40, p.1448-1451.

Constable, P.; Hull, B.; Wicks, J.; Myer, W. Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. **Vet Rec**, 1993, 132, p.383-385.

Coria, M.F.; McClurkin, A.W. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **JAmVet Med Assoc**, 1978, 172, p.449-451.

Cortese, V.S.; Grooms, D.L.; Ellis, J.; Bolin, S.R.; Ridpath, J.F.; Brock, K.V. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. **Am J Vet Res**, 1998, 59, p.1409-1413.

Da Silva, N.; Zardoya, R.; Santurde, G.; Solana, A.; Castro, J.M. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen. **J Virol Methods**, 1995, 55(2), p.209-218.

Deregt, D.; Carman, P.S.; Clark, R.M.; Burton, K.M.; Olson, W.O.; Gilbert, S.A. A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young calves. **J Vet Diagn Invest**, 2002, 14(5), p.433-437.

Diderholm, H.; Dinter, Z. Interference between strains of bovine virus diarrhoea virus and their capacity to suppress interferon of a heterologous virus. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, 1966, 121, p.976-980.

Done, J.; Terlecki, S.; Richardson, C. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. **Vet Rec**, 1980, 106, p.473-479.

Donis, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **Vet Clin N Am: Food Anim Pract**, 1995, 11, p.393-423.

Duffell, S.J.; Harkness, J.W. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. **Vet Rec**, 1985, 117, p.240-245.

Ellis, J.A.; Davis, W.C.; Belden, E.L.; Pratt, D.L. Flow cytometric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Pathology**, 1988, 25, p.231-236.

Ellis, J.A.; West, K.H.; Cortest, V.S.; Myers, S.L.; Carman, S.; Martin, K.M.; Haines, V.M. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 1998, 62, p.161-169.

Entrincan, G.; Dand, A.; Nettleton, P.F. A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. **Vet Microbiol**, 1995, 43(1), p.65-74.

Fenton, A.; Nettleton, P.F.; Entrincan, G.; Herring, J.A.; Malloy, C.; Greig, A.; et al. Identification of cattle infected with bovine virus diarrhoea virus using a monoclonal antibody capture ELISA. **Arch Virol Suppl**, 1991, 3, p.169-174.

Figueiredo, H.C.P.; Vieira, P.R.; Lage, A.P.; Leite, R.C. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Diarreia Viral Bovina em Minas Gerais, Brasil. **Revista Bras. Reprod. Animal**, 1997, 21, p.11-15.

Fino, T.C.; Melo, C.B.; Ramos, A.F.; Leite, R.C. Diarreia Bovina a Vírus (BVD) - Uma breve revisão. **Ver Bras Med Vet**, 2012, 34(2), p.131-140.

Finke, J.; Fritzen, R.; Ternes, P.; Lange, W.; Dolken, G. An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR. **Biotechniques**, 1993, 14, p.448-453.

Flores, E.F.; Ridpath, J.F.; Weiblen, R.; Vogel, F.S.F.; Gil, L.H.V.G. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Res.**, 2002, 87, p.51-60.

Flores, E.F.; Weiblen, R.; Vogel, F.S.F.; Roche, P.M.; Alfieri, A.A.; Pituco, E.M. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq Vet Bras**, 2005, 25(3), p.125-134.

Flores, E.F. **Virologia Veterinária**. Ed. UFSM, Santa Maria, 2007, p.435-462.

Fray, M.D.; Mann, G.E.; Clarke, M.C.; Charleston, B. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. **Theriogenology**, 1999, 51, p.1533–1546.

Fray, M.D.; Mann, G.E.; Clarke, M.C.; Charleston, B. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow. **Vet Microbiol**, 2000, 77, p.185–194.

Fray, M.D.; Mann, G.E.; Bleach, E.C.; Knight, P.G.; Clarke, M.C.; Charleston, B. Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. **Reproduction**, 2002, 123, p.281–9.

Fredriksen, B.; Press, C.M.; Loken, T.; Odegaard, S.A. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Vet Microbiol**, 1999, 64, p.109–122.

Fulton, R.W.; Ridpath, J.F.; Saliki, J.T.; Briggs, R.E.; Confer, A.W.; Burge, L.J.; et al. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. **Can J Vet Res**, 2002, 66(3), p.181-190.

Fulton, R.W.; Ridpath, J.F.; Confer, A.W.; Saliki, J.T.; Burge, L.J. Payton, M.E.; Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, 2003, 31, p.89-95.

Gil, L.H.V.G. **Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não-estruturais de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV)**. Dissertação de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1998, 69p.

Gilbert, S.A.; Burton, K.M.; Prins, S.E.; Deregt, D. Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, 1999, 37, p.2020-2023.

Gillespie, J.; Barholomew, P.; Thompson, R.; McEntee, K. The isolation of noncytopathic virus diarrhoea virus from two aborted fetuses. **Cornell Vet**, 1967, 57, p.564–571.

Goens, D. The evolution of Bovine Viral Diarrhoea: a review. **Can Vet J**, 2002, 43, p.946-964.

Graham, D.A.; McLaren, I.E.; German, A. Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. **Vet J**, 1998, 156(2), p.149-154.

Greig, A.; Gibson, L.R.; Nettleton, P.F.; Herring, J.A. Disease outbreak in calves caused by a mixed infection with infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine virus diarrhoea virus. **The Veterinary Record**, 1981, 108, p.480.

Grooms, D.L.; Ward, L.A.; Brock, K.V. Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Am J Vet Res**, 1996, 57, p.830–833.

Grooms, D.L.; Brock, K.V.; Ward, L.A. Detection of cytopathic bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhoea virus vaccine. **J Vet Diagn Invest**, 1998a, 10, p.130–134.

Grooms, D.L.; Brock, K.V.; Ward, L.A. Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. **J Vet Diagn Invest**, 1998b, 10, p.125–129.

Grooms, D.L.; Brock, K.V.; Pate, J.L.; Day, M.L. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. **Theriogenology**, 1998c, 49, p.595–605.

Grooms, D.L.; Keilen, E.D. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. **Clin Diagn Lab Immunol**, 2002, 4(4), p.898-900.

Grooms, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Vet Clin Food Anim**, 20, 2004, p.5-19.

Gudapty, S.; Atluru, D. In vitro interactions of 15-lipoxygenase metabolites(s) of arachidonic acid and bovine viral diarrhoea virus, in mitogen stimulated bovine mononuclear cells. **Biochemistry Archives**, 1992, 8, p.363-368.

Haines, D.M.; Clark, E.G.; Dubovi, E.J. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Vet Pathol**, 1992, 29, p.27-32.

Hamel, A.L.; Wasylyshen, M.D.; Nayar, G.P. Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. **J Clin Microbiol**, 1995, 33(2), p.287-291.

Hewicker-Trautwein, M.; Trautwein, G. Porencephaly, hydranencephaly and leukoencephalopathy in ovine fetuses following transplacental infection with bovine virus diarrhoea virus: distribution of viral antigen and characterization of cellular response. **Acta Neuropathol** 1994, 87, p.385–397.

Horzinek, M.C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Arch Virol (Suppl.)**, 1991, 3, p.1-5.

Houe, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America**, 1995, 11, p.521-548.

Huck, R. A mucosal disease of cattle. **Vet Rec**, 1957, 69, p.1207–1215.

Hyndman, L.; Vilcek, S.; Conner, J.; Nettleton, P.F. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from bovine fetuses. **J Virol Methods**, 1998, 71, p.69-76.

Innocent, G.; Morrison, I.; Brownlie, J.; Gettinby, G. A computer simulation of the transmission dynamics and the effects of duration of immunity and survival of persistently infected animals on the spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle. **Epidemiology and Infection**, 1997, 119, p.91-100.

Jewett, C.J.; Kelling, C.L.; Frey, M.L.; Doster, A.R. Comparative pathogenicity of selected bovine viral diarrhoea virus isolates in gnotobiotic lambs. **American Journal of Veterinary Research**, 1990, 51, p.1640-1644.

Johnson, D.W.; Muscoplat, C.C. Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhoea. **American Journal of Veterinary Research**, 1973, 34, p.1139-1141.

Jubb, K.; Kennedy, P.; Palmer, P. Pathology of domestic animals. 4th ed. New York (NY): Academic Press Inc, 1985, p.95–100.

Kafi, M.; McGowan, M.; Jillella, D. The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) during follicular development on the superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, 1994, 41, p.223.

Kahrs, R.F.; Scott, F.W.; de Lahunta A. Congenital cerebella hypoplasia and ocular defects in calves following bovine viral diarrhoea-mucosal disease infection in pregnant cattle. **J Am Vet Med Assoc**, 1970, 156, p.1443–1450.

Kendrick, J.W. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. **Am J Vet Res**, 1971, 32, p.533–44.

Ketelsen, A.T.; Johnson, D.W.; Muscoplat, C.C. Depression of bovine monocyte chemotactic responses by bovine viral diarrhoea virus. **Infection and Immunology**, 1979, 25, p.565-568.

Kim, S.G.; Dubovi, E.J. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. **Biologicals**, 2003, 31, p.103-106.

Kirkbride, C.A.; Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **J Vet Diagn Invest**, 1992, 4, p.374–379.

Kirkland, P.; McGowan, M.; Mackintosh, S. Factors influencing the development of persistent infection of cattle with pestivirus. **The 2nd symposium on pestiviruses, Lyon, France**, 1993, p.117–121.

Kirkland, P.D.; McGowan, M.R.; Mackintosh, S.G.; Moyle, A. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. **The Veterinary Record**, 1997, 140, p. 124-127.

Kommisrud, E.; Vatn, T.; Lang-Ree, J.R.; Loken, T. Bovine virus diarrhoea virus in semen from acutely infected bulls. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 1996, 37, p.41-47.

Lambot, M.; Hanon, E.; Lecomte, C.; Hamers, C.; Letesson, J.J.; Pastoret, P.P. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. **Journal of General Virology**, 1998, 79, p.1745-1749.

Larsson, B. A cellular analysis of immunosuppression in cattle with mucosal disease. **Research in Veterinary Science**, 1988, 44, p.71-75.

- Larsson, B.; Jacobsson, S.O.; Bengtsson, B.; Alenius, S. Congenital curly haircoat as a symptom of persistent infection with bovine virus diarrhoea virus in calves. **Arch Virol Suppl**, 1991, 3, p.143–148.
- Liebler-Tenorio, E.M.; Greiser-Wilke, I.; Pohlenz, J.F. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. **Archives of Virology**, 1997, 142, p.1613-1634.
- Liess, B.; Orban, S.; Frey, H-R.; Trautwein, G.; Wiefel, W.; Blindow, H. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90–229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). **Zentbl Vet Med B**, 1984, 31, p.669–681.
- Løken, T. Ruminant Pestivirus Infections in animals other than cattle and sheep. **Veterinary Clinics of North America**, 1995, 11, p.597-614.
- Lopez, O.J.; Osorio, F.A.; Kelling, C.L.; Donis, R.O. Presence of bovine viral diarrhoea virus in lymphoid cell populations of persistently infected cattle. **Journal of General Virology**, 1993, 74, p.925-929.
- Mahlum, C.E.; Haugerud, S.; Shivers, J.L.; Rossow, K.D.; Goyal, S.M.; Collins, J.E.; et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. **J Vet Diagn Invest**, 2002, 14, p.120-125.
- Markahm, R.J.F.; Ramnaraine, M.L. Release of immuno-suppressive substances from tissue culture cells infected with bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, 1985, 46, p.879-881.
- McClurkin, A.W.; Littledike, E.T.; Cutlip, R.C.; Frank, G.H.; Coria, M.F.; Bolin, S.R. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. **Can J Comp Med**, 1984, 48, p.156–161.
- McGowan, M.R.; Kirkland, P.D.; Richards, S.G.; Littlejohns, I.R. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. **Vet Rec**, 1993, 133, p.39–43.
- Melo, C.B.; Oliveira, A.M.; Figueiredo, H.C.P.; Leite, R.C.; Lobato, Z.I.P. Prevalência de anticorpos contra o Herpesvírus Bovino-1, vírus da diarréia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do estado do Sergipe, Brasil. **Revista Bras. Reprod. Anim.**, 1997, 21(2), p.160-161.
- Mignon, B.; Waxweiler, S.; Thiry, E.; Boulanger, D.; Dubuisson, J.; Pastoret, P.P. Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting bovine viral diarrhoea pestivirus antigens in field blood samples of persistently infected cattle. **J Viral Methods**, 1992, 40(1), p.85-93.

- Moerman, A.; Straver, P.J.; De Jong, M.C.; Quak, J.; Baanvinger, T.; Van Oirschot, J.T. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: A longitudinal study. **Veterinary Quarterly**, 1994, 16, p.115-119.
- Munoz-Zanzi, C.A.; Johnson, W.O.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. **J Vet Diagn Invest**, 2000, 12, p.195-203.
- Munoz-Zanzi, C.A.; Hietala, S.K.; Thurmond, M.C.; Johnson, W.O. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. **Am J Vet Res**, 2003, 64, p.358-365.
- Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.J.; Horcinek, M.C.; Studdert, M.J. Flaviviridae. In: **Veterinary Virology**, 3<sup>rd</sup> ed. New York, Academic Press, 1999.
- Murray, R. A field investigation into causes of bovine abortion in dairy cattle. **Vet Rec**, 1990, 127, p.543-547.
- Murray, R. Lesions in aborted fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. **Arch Virol**, 1991, Supp. 3, p.217-224.
- Muscoplat, C.C.; Johnson, D.W.; Stevens, J.B. Abnormalities of in vitro lymphocyte responses during viral diarrhoea virus infection. **American Journal of Veterinary Research**, 1973, 34, p.753-755.
- Njaa, B.L.; Clark, E.G.; Janzen, E.; Ellis, J.A.; Haines, D.M. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. **J Vet Diagn Invest**, 2000, 12(5), p.393-399.
- Olafson, P.; MaCallum, A.; Fox, F. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Vet**, 1946, 36, p.205-213.
- Orban, S.; Liess, B.; Hafez, S.; Frey, H.; Blindow, H.; Sasse-Patzer, B. Studies on transplacental transmissibility of bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. **Zentralblatt für Bakteriologie Supplementum**, 1983, 30, p.619-634.
- Pellerin, C.; Hurk, J.V.D.; Lecomte, J.; Tijssen, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, 1994, 203, p.260-268.
- Penny, C.D.; Low, J.C.; Nettleton, P.F.; Scott, P.R.; Sarginson, N.D.; Strachan, W.D.; Honeyman, P.C. Concurrent bovine viral diarrhoea virus and *Salmonella typhimurium* DT104 infection in a group of pregnant dairy heifers. **The Veterinary Record**, 1996, 138, p.485-489.
- Pfeffer, M.; Freyburg, M.V.; Kaaden, O.R.; Beer, M. A universal "one-tube" RT-PCR protocol for amplifying isolates of bovine viral diarrhoea virus. **Vet Res Commun**, 2000, 24, p.491-503.

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

Plavsic, M.Z.; Prodafikas, G. Evaluation of a new sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in unprocessed fetal bovine serum. **J Vet Diagn Invest**, 2001, 13(3), p.261-262.

Polreis, J.H. Dual BRSV-BVDV infection has synergistic effects. **Topics in Veterinary Medicine**, 1995, 6, p.22-30.

Potgieter, L.N.D.; McCracken, M.D.; Hopkins, F.M.; Guy, J.S. Comparison of the pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, 1985, 46, p.151-153.

Potgieter, L.N.D. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America**, 1995, 11, p.501-520.

Potgieter, L.N.D. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America**, 1997, 13, p.471-481.

Potgieter, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease In: Coetzer, J.A.W.; Tustin, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**, 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press Southern Africa, 2004, v.2, p.946-969.

Potter, M.L.; Corstvet, R.E.; Looney, C.R.; Fulton, R.W.; Archbald, L.F.; Godke, R.A. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus uptake by preimplantation embryos. **Am J Vet Res**, 1984, 45, p.1778-80.

Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10<sup>th</sup> ed. Saunders-Elsevier, Edinburgh, 2007, 2156 p.

Renshaw, R.W.; Ray, R.; Dubovi, E.J. Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. **J Vet Diagn Invest**, 2000, 12, p.184-186.

Richer, L.; Marois, P.; Lamontagne, L. Association of bovine viral diarrhoea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. **Canadian Veterinary Journal**, 1988, 29, p.713-717.

Ridpath, J.F.; Hietala, S.K.; Sorden, S.; Neill, J.D. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections. **J Vet Diagn Invest**, 2002, 14(2), p.303-307.

Ridpath, J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. **Vet Clin Food Anim**, 2010, 26, p.335-348.



Roberts, D.H.; Lucas, M.H.; Wibberley, G.; Westcott, D. Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leucosis virus. **The Veterinary Record**, 1988, 122, p.293-296.

Rosenberger, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993, p.249-353.

Rossi, C.R.; Kiesel, G.K.; Hoff, E.J. Factors affecting the assay of bovine type I interferon on bovine embryonic lung cells. **American Journal of Veterinary Research**, 1980, 41, p.552-556.

Roth, J.A.; Kaeberle, M.L.; Griffith, R.W. Effects of bovine viral diarrhea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function. **American Journal of Veterinary Research**, 1981, 42, p.244-250.

Roth, J.A.; Kaeberle, M.L. Suppression of neutrophil function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhea virus with and without the administration of ACTH. **American Journal of Veterinary Research**, 1983, 44, p.2366-2370.

Rufenacht, J.; Schaller, P.; Audige, L.; Knutti, B.; Kupfer, U.; Peterhans, E. The effect of infection with bovine viral diarrhea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. **Theriogenology**, 2001, 56, p.199-210.

Saliki, J.T.; Fulton, R.W.; Hull, S.R.; Dubovi, E.J. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle serum. **J Clin Microbiol**, 1997, 35(4), p.803-807.

Saliki, J.T.; Huchzermeier, R.; Dubovi, E.J. Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus. **Ann N Y Acad Sci**, 2000, 916, p.358-363.

Saliki, J.T.; Dubovi, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Vet Clin Food Anim**, 2004, 20, p.69-83.

Samara, S.I.; Dias, F.C.; Moreira, S.P.G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do estado de Minas Gerais e nordeste do estado de São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sc.**, 2004, 41, p.369-403.

Sandvik, T.; Krogsrud, J. Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle blood samples. **J Vet Diagn Invest**, 1995, 7(1), p.65-71.

Scherer, C.F.C.; Flores, E.F.; Weiblen, R.; Kreutz, L.C.; Durr, J.W.; Brum, L.P.; Quadros, V.L.; Lima, M. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesq. Vet. Bras.**, 2002, 22, p.45-50.

Schmitt, B.J.; Lopez, O.J.; Ridpath, J.F.; Galeota-Wheeler, J.; Osorio, F.A. Evaluation of PCR for diagnosis of bovine viral diarrhea virus in tissue homogenates. **J Vet Diagn Invest**, 1994, 6, p.44-47.

Scott, F.W.; Kahrs, R.F.; Parsonson, I.M. A cytopathogenic strain of bovine viral diarrheamucosal disease virus isolated from a bovine fetus. **Cornell Vet**, 1972, 62, p.74–84.

Scott, F.W.; Kahrs, R.F.; de Lahunta, A.; Brown, T.T.; McEntee, K.; Gillespie, J.H. Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. **Cornell Vet**, 1973, 63, p.536–560.

Shope. R. Comments on bovine viral diarrhoea-mucosal disease. **J Am Vet Med Assoc**, 1968, 152, p.769.

Scruggs, R.S.; Fleming, S.A.; Maslin, W.R.; Groce, A.W. Osteopetrosis, anemia, thrombocytopenia, and marrow necrosis in beef calves naturally infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 1995, 7, p.555-559.

Singh, E.; Eaglesome, M.; Thomas, F.; Papp-Avidd, G.; Hare, W. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections I. The in vitro exposure of preimplantation embryos to akabane virus, blue tongue virus, and bovine viral diarrhoea virus. **Theriogenology**, 1982, 17, p.437–444.

Spagnuolo, M.; Weaver, M.; Allan, G.M.; Kennedy, S.; Foster, J.C.; Adair, B.M. Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. **Journal of Diagnostic Investigation**, 1997, 9, p.287-297.

Sprecher, D.; Baker, J.; Holland, R.; Yamini, B. An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. **Theriogenology**, 1991, 36, p.567–606.

Ssentongo, Y.; Johnson, R.; Smith, J. Association of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. **Aust Vet J**, 1980, 56, p.272–273.

Stott, E.J.; Thomas, L.H.; Collins, A.P.; Crouch, S.; Jebbet, J.; Smith, G.S.; Luther, P.D.; Coswell, R. A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their associations with disease. **Journal of Hygiene**, Cambridge, 1980, 85, p.257-270.

Strauss, E.G.; Strauss, J.H.; Levine, A.J. Virus evolution. In: Fields, N.B.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. **Fundamental Virology**, Raven Publ., Philadelphia, 1996, p.141-159.

Tajima, M.; Yazawa, T.; Hagiwara, K.; Kurosawa, T.; Takahashi, K. Diabetes mellitus in cattle infected with bovine viral diarrhoea mucosal disease virus. **Journal of Veterinary Medicine A**, 1992, 39, p.616-620.

Taylor, L.F.; Van Donkersgoed, J.; Dubovi, E.J.; Harland, R.J.; van den Hurk, J.V.; Ribble, C.S.; et al. The prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in a population of feedlot calves in western Canada. **Can J Vet Res**, 1995, 59, p.87-93.

Terpstra, C.; Wensvoort, G. A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: Clinical, virological and immunological observations. **Veterinary Quarterly**, 1997, 19, p. 97-101.

Tessaro, S.V.; Carman, P.S.; Deregt, D. Viremia and virus shedding in elk infected with type 1 and virulent type 2 bovine viral diarrhea virus. **Journal of Wildlife Diseases**, 1999, 35, p.671-677.

Thomas, L.H.; Stott, E.J.; Collins, A.P.; Jebbet, N.J.; Stark, A.J. Evaluation of respiratory disease in calves: Comparison of disease response to different viruses. **Research in Veterinary Science**, 1977, 23, p.157-164.

Thompson, J.A.; Gonçalves, V.S.P.; Leite, R.C.; Bandeira, D.A.; Miranda, R.H.L. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the state of Paraíba, Brazil. **Prev. Vet. Med.**, 2006, 76, p.290-301.

Truitt, R.L.; Shechmeister, I.L. The replication of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus in bovine leukocytes in vitro. **Archiv Für Die Gesamte Virusforschung**, 1973, 42, p.78-87.

Turk, J.R.; Corstvet, R.E.; McClure, J.R. Synergism of bovine virus diarrhea virus and *Pasteurella haemolytica* serotype I in bovine respiratory disease complex: 1. Leukocyte alterations and pulmonary lesion volumes. In: **Proceedings American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Annual Meeting**, 1985, 28, p.67-80.

Vidor, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Rio Grande do Sul. **Bolm Inst Pesq Vet Desidério Finamor (Supl. Esp.)**, 1974, 2, p.51-58.

Virakul, P.; Fahning, M.; Joo, H.; Zemjanis, R. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. **Theriogenology**, 1988, 29, p.441-449.

Walz, P.H.; Bell, T.G.; Steficek, B.A.; Kaiser, L.; Maes, R.K.; Baker, J.C. Experimental models of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 1999, 11, p.505-514.

Ward, G.M.; Roberts, S.J.; McEntee, K.; Gillespie, J.H. A study of experimentally induced bovine viral diarrhea-mucosal disease in pregnant cows and their progeny. **Cornell Vet**, 1969, 59, p.525-538.

Welsh, M.D.; Adair, B.M.; Foster, J.C. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 1995, 46, p.195-210.

Wilhelmsen, C.L.; Bolin, S.R.; Ridpath, J.F.; Cheville, N.F.; Kluge, J.P. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhea viral infections in six-month-old calves. **Veterinary Pathology**, 1990, 27, p.235-243.

Wilson, T.M.; de Lahunta, A.; Confer, L. Cerebellar degeneration in dairy calves: clinical, pathologic, and serologic features of an epizootic caused by bovine viral diarrhea virus. **J Am Vet Med Assoc**, 1983, 183, p.544-547.

Woodard, L. BVD virus associated with outbreaks of abortion, stillbirths, and weak calves. **Vet Med**, 1994, 89, p.379-384.

Woods, G.T.; Krone, J.; Mansfield, M.E.; Cmarik, G. Bovine virus diarrhoea associated with severe pneumotropism. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, 1973, 48, p.418-422.

Yamini, B.; Trapp, A.; Mullaney, T. Abortions in bovine, ovine and caprine: 1,038 cases (1983–1989). **33rd Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Denver (CO)**, 1990, p.18.

Yates, W.D.G. Interaction between viruses and bacteria in bovine respiratory disease. **Canadian Veterinary Journal**, 1986, 25, p.37-41.

Zhang, G.; Aldridge, S.; Clarke, M.C.; McCauley, J.W. Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. **Journal of General Virology**, 1996, 77, p.1677-1681.

Zurovac, O.; Stringfellow, D.; Brock, K.; Riddell, M.; Wright, J. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in a system for in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, 1994, 41, p.841–853.