Flávia da Silva Nogueira

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM PROPRIEDADES DA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2003

FLÁVIA DA SILVA NOGUEIRA

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM PROPRIEDADES DA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de setembro de 2003

Profª. Márcia Rogéria de Almeida (Conselheira)	Prof. José Lúcio dos Santos (Conselheiro)
Profª. Paula Dias Bevilacqua	Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto

Prof. Mauro Pires Moraes
(Orientador)

A Paulo José Colombo Nogueira, meu pai.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, que conspirou a meu favor.

Ao meu orientador Mauro Pires Moraes, pelo incentivo, competência, por todo ensinamento a mim dispensado, e principalmente por toda a amizade.

À minha família, em especial Mamãe, que apesar de todas as nossas dificuldades, com muito amor e dedicação, sempre primou por nossa formação e educação. E a Gau, minha irmã querida, por todo amor e amizade.

Ao Adjalma, por todo carinho e companheirismo ao longo de todos esses anos.

Aos meus irmãos de coração: Helen, Juliana, Fabi, Luciana, Renato, André, Negão, Beto, Fraldinha e Ricardo, sem vocês eu teria ido embora de Viçosa na primeira semana. Vocês são inesquecíveis.

Ao pessoal do Laboratório do DVT, por tudo, principalmente por fazer o trabalho uma coisa divertida e bem humorada.

À galera do laboratório, principalmente Ângelo, Andreza, Abelardo e Sabrina, pelo apoio técnico e acima de tudo pelos ótimos momentos de diversão.

A Larissa, por sua dedicação a ciência e ajuda primordial no experimento.

Aos meus queridos conselheiros, Márcia Rogéria de Almeida e José Lúcio dos Santos, pela paciência e ensinamentos de grande valia.

ÍNDICE

RESUMO……V
ABSTRACT……VII

INTRODUÇÃO GERAL 01
REVISÃO DE LITERATURA 03
OBJETIVOS 13
MATERIAIS E MÉTODOS.....14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....19
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....37

RESUMO

NOGUEIRA, Flávia da Silva. Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2003. **Diagnóstico da infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina em propriedades da microrregião de Viçosa.** Orientador: Mauro Pires Moraes. Conselheiros: Márcia Rogéria de Almeida e José Lúcio dos Santos.

O vírus da diarréia viral bovina (bovine viral diarrhea virus ou BVDV) é um vírus pequeno (40-60 nm), com envelope lipoprotéico, que possui como ácido nucléico uma molécula de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, de aproximadamente 12,5 kilobases. O BVDV foi recentemente classificado como membro da família FLAVIVIRIDAE, gênero pestivírus, junto com o vírus da peste suína clássica (hog cholera virus) e o vírus da doença da fronteira (border disease virus). A infecção de bovinos pelo BVDV é associada a diversas manifestações clínicas que incluem desde enfermidade febril suave até enfermidades fatais como a doença das mucosas e doença hemorrágica. Os principais aspectos patogênicos da infecção estão relacionados a habilidade do vírus em infectar células do sistema imune e de atravessar a placenta e infectar o feto. O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas significantes à pecuária bovina em todo o mundo. Ainda há restrito conhecimento sobre a enfermidade em Minas Gerais (MG) e no Brasil, embora vários relatos clínicos, virológicos e sorológicos indiquem a presença do vírus no rebanho bovino do país. Este trabalho promoveu um estudo sistemático da infecção pelo BVDV no rebanho bovino das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova. O trabalho usou técnicas de

identificação do BVDV em cultivo em monocamada de células MDBK, a imunofluorescência indireta, utilizando-se cepas referência para os tipos I e II do BVDV. Também foram testadas para a presença de viremia amostras de soro sanguíneo fetal, coletadas em frigoríficos e amostras de animais jovens de propriedades com a presença de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina. Os fetos utilizados neste estudo apresentavam tamanho igual ou superior a 30cm e os animais das propriedades positivas para a infecção apresentavam-se com 6 a 10 meses de idade e não possuíam anticorpos detectáveis para BVDV. Além disso, foram testados soro sanguíneo de animais adultos pela técnica de soroneutralização de propriedades produtoras de leite, carne ou produção combinada. A avaliação das amostras de soro sanguíneo fetal e de animais jovens para a presença do BVDV pela técnica de isolamento em cultivo celular e identificação viral pela técnica de imunofluorescência indireta foram negativos. Esses resultados indicam que a prevalência de animais persistentemente infectados pode ser muito baixa na população estudada. Os resultados quanto à presença de anticorpos contra o BVDV em rebanhos da região da Zona da Mata em 14,3% dos animais testados corroborou com essa observação. Os níveis de anticorpos encontrados foram maiores quando testados contra o vírus BVDV isolado VS253, um representante citopático do tipo II, comparados àqueles testados para o isolado Singer, citopático do tipo I. Tomados em conjunto estes resultados indicam que a presença do vírus da Diarréia Viral Bovina e, por conseqüência, seu impacto econômico no rebanho bovino nessa região, é menor que os estimado por levantamentos sorológicos dirigidos àquelas propriedades com histórico suspeito da infecção. Portanto, práticas de diagnóstico e controle devem ser reavaliados e adequados para a situação atual da população bovina.

Palavras-chave: Vírus da Diarréia Viral Bovina, flavírus, bovino, infecção.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Flávia da Silva. Universidade Federal de Viçosa, Setember, 2003. **Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Virus infection in herds of microregion of Viçosa.** Adviser: Mauro Pires Moraes. Committee members: Márcia Rogéria de Almeida e José Lúcio dos Santos.

The Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) belongs to the family Flaviviridae and it is a member of the genus Pestivirus. BVDV has a worldwide distribution and infection in cattle is common, which is evidenced by a high level of seropositive animal in the infected population. The major economical damage caused by BVDV in susceptible herds is still caused by intrauterine infections and it depends on the age of fetus. The infection during the first third of pregnancy could generate immunotolerant animals that would present a persistent infection (PI) condition. The impact of the infection of BVDV in the bovine population of Minas Gerais is unknown. The objective of this investigation is to characterize the occurrence of the BVDV infection by detection of the PI animals and the level of antibodies in herds.. For PI detection, we tested 385 samples of serum, 214 of those from fetuses collected at slaughtering house and 171 from young (six to 10 month old) animals, by virus isolation in MDBK cells. Three blind passages were made before the MDBK cells were tested by indirect immunofluorescence (IFI) using a poll of monoclonal antibodies against BVDV. Additionally, sera of 315 unvaccinated adult animals were tested by serum neutralization test (SN). All the samples tested by passage in MDBK were negative when tested by IFI. The prevalence of antibodies

found in the adult population was 14.3% (44/315) and titles were between 2 to 128. Current knowledge about BVDV indicates that herds with 40 to 80% of antibody prevalence could result in 1 to 3% of PI. Moreover, the titles of antibodies in population where the virus are present usually are higher than we found in the SN assay. The low antibody prevalence associated with low titles could explain the lack of BVDV isolation.
Keywords: Bovine Diarrhea virus, prevalence, neutralizing antibody

Introdução

A diarréia viral bovina é uma doença causada pelo vírus da diarréia viral bovina vírus (BVDV), pertencente à família *Flaviviridae*, a qual é composta pelo vírus da Peste Suína Clássica, que foi erradicada em algumas regiões do Brasil, e o vírus da Doença das Fronteiras (Border Disease), considerado exótico no país.

A diarréia viral bovina tem distribuição mundial, o primeiro surto diagnosticado ocorreu em março de 1946 nos EUA sendo o vírus descrito pela primeira vez em 1954 nesse mesmo país (Baker et al., 1954). No Brasil, o primeiro isolamento viral ocorreu em 1993, no Rio Grande do Sul (Roech et al., 1995; Oliveria et al., 1996).

Os estudos dessa doença, em regiões da Europa e EUA apontaram uma prevalência de 70 a 80% dos animais adultos, em regiões endêmicas (Houe, 1992; Donis, 1995). Estudos preliminares no Brasil, na região do Rio Grande do Sul, apontaram uma prevalência de aproximadamente 60% , no estado de Goiás, através de soroneutralização, obteve-se 34,5% (Brito et al., 2002) e na região do triângulo mineiro, a prevalência foi de 55,8%, usando ELISA como teste (Mineo et al., 2002), não sendo os resultados muito diferentes dos encontrados pelo mundo. (Canal et al., 1998).

Essa doença já foi também isolada em animais da ordem Artiodactila, inclusive animais selvagens (Sausker, E.A., 2002; Zupancic et al., 2002).

O BVDV apresenta dois tipos, sendo um tipo não-citopatogênico e o outro tipo citopatogênico, assim denominado pela sua capacidade de destruir cultivos

celulares. Variações estabeleceram outra classificação em tipos antigênicos diferentes, tipo I e tipo II. O tipo I está relacionado com a forma clássica da doença, Doença das Mucosas e o tipo II relacionado com uma forma mais patogênica, chamada Doença Hemorrágica. As duas formas já foram isoladas no Brasil (Gil et al, 1998).

A doença causada por BVDV tem como seu principal artifício a geração de fetos, infectados no primeiro semestre de gestação, que desenvolvem freqüentemente, imunotolerância, caracterizada pela replicação viral no organismo fetal sem resposta imune. A infecção de fêmeas gestantes, entre 40 e 120 dias de gestação com amostras ncp, é, freqüentemente, seguida de infecção com indução de tolerância imunológica. Fetos infectados nesse período nascem persistentemente infectados (PI), são usualmente soronegativos e eliminam o vírus em grande quantidade nas secreções, incluindo secreções nasais, digestivas, saliva, fezes, sêmen e urina (Brownlie, 1990; McClurkin et al., 1985). Os animais PI representam o principal reservatório da infecção pelo BVDV, por constituírem-se em fontes contínuas de disseminação do vírus. Em regiões endêmicas, calcula-se que de 1 a 2% dos animais sejam PI. Em animais PI, é comum o desenvolvimento de uma enfermidade aguda e altamente fatal chamada Doença das Mucosas (Brownlie, 1990; McClurkin et al., 1985).

Apesar da presença confirmada da doença no Brasil e estudos relatando uma prevalência elevada nos rebanhos bovinos de alguns estados, ainda há poucos estudos a respeito de BVDV no país.

O estudo da prevalência e o isolamento viral do BVDV nos rebanhos brasileiros são de suma importância, para que seja feito um diagnóstico real da situação desses rebanhos e com isso se desenvolvam formas de combate e erradicação da doença no Brasil.

O objetivo desse trabalho foi a detecção da presença de atividade viral do BVDV e presença de animais persistentemente infectados nos rebanhos das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova, através de técnicas sorológicas e isolamento de cepas presentes nesse rebanho.

Revisão Bibliográfica

A diarréia viral bovina é uma doença causada pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV), pertencente à família *Flaviviridae*, a qual é composta pelo vírus da Peste Suína Clássica, que foi erradicada em algumas regiões do Brasil, e o vírus da Doença das Fronteiras (Border Disease), considerado exótico no país.

O vírus da diarréia viral bovina (bovine viral diarrhea vírus ou BVDV), era classificado como sendo da família *Togaviridae*, atualmente, foi reclassificado como vírus da família *Flaviviridae* (Wengler, G., 1991), sendo o vírus da febre amarela o protótipo da família, fazendo parte do gênero pestivírus, onde se encontram os vírus da Peste Suína Clássica e o vírus da Doença da Fronteira. Essa reclassificação baseou-se na estrutura molecular do genoma e nas estratégias de replicação dos *pestivírus*, que são bastante semelhantes aos *flavivírus* (Francki et al., 1991; Collet et al., 1989; Westaway et al., 1985).

O vírus BVDV mede de 40-60 nm, e contem um nucleocapsídeo esférico, de simetria icosaédrica envolto por um envelope lipoprotéico (Horzinek, 1981). Possui como ácido nucléico uma molécula de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, de aproximadamente 12,5 kilobases, envolto por uma proteína viral de caráter básico (Horzinek, 1981; Collet et al., 1989). O vírus BVDV contém uma grande ORF (open readding-frame), precedida de uma região altamente conservada de 380-390 nucleotídeos (5' UTR) (Collet et al., 1988). Essa ORF codifica uma poliproteína, a qual é clivada durante ou após a tradução por proteases celulares ou virais

(Wiskerchen et al., 1991; Collet et al., 1988). Essa poliproteína tem a seguinte constituição: NH2-Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Elbers et al., 1996). Sendo o envelope formado por uma membrana lipídica derivada de membranas celulares e contém três glicoproteínas chamadas de E0/gp48, E1/gp25 e E2/gp53 (Weiland et al., 1992; Thiel et al., 1991), sendo encontradas inseridas no envelope viral. A glicoproteína E2 contem os maiores sites de reconhecimento para a produção de anticorpos neutralizantes contra o BVDV em animais vacinados ou infecção natural. A seqüência genética que codifica parte da proteína E2 é extremamente variável entre cepas de BVDV, o que provavelmente reflete na dificuldade do sistema imune reconhecer esses locais de neutralização.

A proteína não estrutural NS23/p125 é considerada a mais importante proteína envolvida na replicação viral. Como característica do vírus, a proteína NS23/p125, ocasionalmente é clivada, originando dois produtos adicionais, NS2/p54 e NS3/p80. A produção da proteína NS3/p80 em alguns isolados de BVDV é correlacionada com a citopatogenicidade em cultivos celulares, sendo esses isolados caracterizados como BVDV cp (citopático). Por outro lado, a maioria dos isolados expressa apenas o polipeptídeo NS23/p125 e não produzem citopatogenicidade, sendo classificados como BVDV ncp (não-citopático) (Kreutz et al., 2000), sendo considerados dois biotipos distintos. Amostras de campo de BVDV são classificadas em biótipos citopáticos e não-citopáticos, de acordo com o efeito de sua replicação em cultivo celular (McClurkin et al., 1985; Tobias et al., 2000). O efeito citopático pode ser definido como o dano celular resultante da infecção pelo vírus às células, sendo visualizado através de alterações na morfologia celular, como formação de vacúolos, exemplo que ocorre em cultivos celulares infectados com BVDV. Esses defeitos demonstram que os vírus utilizam gradualmente a maquinaria celular durante seu processo de replicação

Os vírions não são facilmente purificados ou visualizados por microscopia eletrônica devido a características físicas que dificultam sua separação dos materiais celulares (Horzinek, 1981).

Nas infecções naturais, o BVDV tem um tropismo marcante por células do

sistema imune, sobretudo monócitos/macrófagos, linfócitos, “null cells” e por células epiteliais do intestino (Marshall, 1993; Bielefeldt, 1990; 1988; Brownlie, 1990). A infecção de fêmeas prenhes, freqüentemente, é seguida de transmissão transplacentária ao feto. A infecção fetal é caracterizada por replicação viral em células do sistema imune e também células do sistema nervoso central (SNC) (Brownlie, 1985; 1990; Bielefedt, 1988). A infecção de células do SNC parece ser responsável por patologias neurológicas associadas à infecção, tais como microencefalia, malformações, hipoplasia cerebelar, entre outras (Brownlie, 1990).

In vivo, o BVDV infecta células do sistema imune apesar de virtualmente todas as células de cultivo derivadas de bovinos e de espécies relacionadas são susceptíveis à infecção pelo BVDV *in vitro* (Bolin et al., 1994; Potts et al., 1989; Nettleton & Entrican, 1992). Além disso, o BVDV tem sido freqüentemente detectado como contaminante de células de cultivo de outras espécies, como primatas, humanas, coelhos e até de insetos (Bolin et al., 1994; Potts et al., 1989; Nuttal et al., 1977). A contaminação é resultante do uso de soro fetal bovino, contaminado com o vírus, como promotor de crescimento (Bolin et al., 1994; Nuttal et al., 1977). O uso de soro eqüino tem sido aplicado a estudos desenvolvidos com o BVDV para que se evite esse tipo de contaminação.

A infecção de bovinos pelo BVDV está associada a diversas manifestações clínicas que incluem desde enfermidade febril suave até enfermidades fatais como a doença das mucosas e doença hemorrágica (Brownlie, 1985; 1990; Pellerin et al., 1994). Os principais aspectos da patogênese da infecção estão relacionados à habilidade do vírus infectar células do sistema imune e de atravessar a placenta e infectar o feto. A infecção viral provavelmente ocorre pela via oro-nasal. Outras vias de menor importância são através do sêmen, picaduras de insetos e formas iatrogênicas. Ao entrar em contato com a mucosa, o vírus inicia sua fase replicativa, que ocorre nas células epiteliais, tendo predileção pelas tonsilas palatinas. A distribuição do vírus pelo organismo ocorre através do vírus livre na corrente sanguínea e também em leucócitos infectados, particularmente linfócitos e monócitos. O isolamento do vírus no soro e em leucócitos é possível entre três e dez dias pós-infecção (Odeon et al., 1994; McClurkin et al., 1985). O vírus infecta vários

tecidos, tendo preferência pelos tecidos linfóides, podendo esse tropismo variar de acordo com os tipos virais. A maioria das infecções de animais adultos imunocompetentes, no entanto, parece ser subclínica ou acompanhada de sintomatologia moderada (Brownlie, 1990). Em geral, as manifestações clínicas associadas à infecção podem ser agrupadas em várias síndromes. A infecção aguda de animais imunocompetentes geralmente apresenta-se acompanhada de sintomas inespecíficos de intensidade moderada tais como inapetência, hipertermia, corrimento nasal e leucopenia. Sinais digestivos como diarréia são eventualmente observados. A infecção respiratória pelo BVDV é um dos principais componentes da síndrome que acomete novilhos transportados a locais de engorda, denominada “febre do transporte”. A infecção de fêmeas gestantes tem conseqüências diversas, dependendo da imunidade da fêmea, período de gestação em que a infecção ocorre e da cepa viral. Mortalidade embrionária e infertilidade, mumificação fetal ou abortamento, malformações fetais ou aparecimento de natimortos ou inviáveis são conseqüências comuns da infecção intra-uterina (Brownlie, 1990).

De especial interesse epidemiológico é a infecção fetal com indução de imunotolerância. Animais prenhes que adquirem a infecção antes de 40 dias de gestação, resulta em morte embrionária; animais prenhes em período gestacional entre 40-125 dias, resultam em abortamentos ou nascimento de animais persistentemente infectados, e animais prenhes que foram infectados acima de 125 dias de gestação, parirão bezerros doentes e fracos, que, dificilmente, virão a termo (Grooms et al., 2002).

Fetos infectados entre 40 e 125 dias de gestação, freqüentemente desenvolvem imunotolerância, que é caracterizada pela replicação viral no organismo fetal sem resposta imune. A infecção de fêmeas gestantes, entre 40 e 125 dias de gestação com amostras não citopáticas é freqüentemente seguida de infecção com indução de tolerância imunológica. Fetos infectados nesse período nascem persistentemente infectados (PI), são usualmente soronegativos e eliminam o vírus em grande quantidade nas secreções, incluindo secreções nasais, digestivas, saliva, fezes, sêmen e urina (Brownlie, 1990; McClurkin et al., 1985).

A fração celular do sangue se constitui na fonte mais abundante e confiável para fins de isolamento (McClurkin et al., 1985; Odeon et al., 1994). O isolamento de vírus do sangue de feto é indicativo da prevalência da infecção, e em particular, da ocorrência de animais portadores da infecção persistente (Houe, 1992; Brownlie, 1990). A detecção de anticorpos, através de diferentes testes sorológicos, tem sido usada como indicativo da presença do agente em certas áreas ou populações de bovinos (Houe, 1992). A sorologia do rebanho revela a prevalência da infecção e pode ser considerada um indicativo da dinâmica da infecção e da presença/ausência de animais persistentemente infectados no rebanho (Houe, 1992). Os animais PI representam a principal fonte de disseminação da infecção pelo BVDV, atuando de forma contínua, sendo um dos principais fatores a serem considerados na epidemiologia da doença. Em regiões endêmicas, calcula-se que de 1 a 2% dos animais sejam PI. Em animais PI, é comum o desenvolvimento de uma enfermidade aguda e altamente fatal chamada Doença das Mucosas (Brownlie, 1990; McClurkin et al., 1985).

Variações principalmente antigênicas, genômicas e epidemiológicas estabeleceram outra classificação em tipos antigênicos diferentes, tipo I e tipo II. O tipo I está relacionado com a forma clássica da doença, Doença das Mucosas (DM) e o tipo II relacionado com uma forma mais patogênica, chamada Doença Hemorrágica. Os dois tipos já foram identificadas no Brasil (Gil et al, 1998).

A etiologia dessa forma clínica, DM, é atribuída a uma mutação do vírus original, dando origem a um vírus mutante citopatogênico (cp) (McClurkin et al., 1985; Meyers et al., 1991; 1992). A etiopatogenia da DM é atribuída a uma superinfecção dos animais PI com um vírus cp, geralmente originado a partir do vírus ncp original através de mutações e,ou recombinações no genoma, sendo as alterações mais comuns provenientes de duplicação de genes, inserção da seqüência do hospedeiro, deleção ou pontos de mutação (Meyers et al., 1991; 1992; Greiser-Wilke et al., 1993), podendo ainda apresentar, antigenicamente, diferenças marcantes do vírus ncp, apresentando como única estrutura semelhante à proteína NS23. O vírus mutante, por ser antigenicamente idêntico ao vírus original, replica sem que haja detecção pelo sistema imune, induzindo patologias que são

inevitavelmente fatais.

Os animais PI, que apresentaram o vírus ncp, apresentarão Doença das Mucosas devido a uma alteração da proteína viral não estrutural p125. A p125 será clivada e formará a proteína não estrutural p80, que é responsável pela citopatogenicidade viral. Essa cepa citopatogênica irá levar ao desenvolvimento da Doença das Mucosas. As amostras cp constituem uma minoria e são isoladas quase que exclusivamente de animais afetados pela Doença das Mucosas (DM), mas não unicamente, podendo estar relacionadas também a doenças reprodutivas, além de terem sido isoladas de animais clinicamente sadios (Bolin et al., 1985; Brownlie et al., 1985; Grummer et al., 2001).

As amostras ncp representam a grande maioria das amostras de campo e estão associadas a diversas manifestações clínicas da infecção.

In vitro, o BVDV ncp não apresenta mudanças visíveis nas células infectadas, enquanto BVDV cp induz a vacuolização e morte celular (Baker et al., 1954; Grummer et al., 2001).

Recentemente, uma forma de Doença das Mucosas chamada de Doença das Mucosas crônica vem sendo descrita, sendo sua patogenia pouco explicada.

Nos últimos anos, cepas de BVDV altamente virulentas têm sido associadas à Doença Hemorrágica com altos índices de mortalidade (Corapi et al., 1989; Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994). O vírus BVDV, por análises filogenéticas, baseadas na seqüência 5'UTR, foi dividido em dois genótipos, que atualmente são conhecidos como BVDV tipo I e BVDV tipo II, sendo considerados espécies distintas, pois apresentam variações . Essa divisão é de grande importância, porque demonstrou variações antigênicas de grande relevância para o desenvolvimento de vacinas. Diferença em patogênese aguda existe entre os dois genótipos. Os isolados de casos de Doença Hemorrágica foram classificados como BVDV tipo II, diferentes dos isolados tradicionais (Corapi et al., 1989; Ridpath et al., 1994; Pellerin et al., 1994). Enfermidade febril aguda acompanhada de trombocitopenia e diarréia profusa e hemorrágica são características da infecção por cepas do tipo II (Corapi et al., 1989).

A infecção natural pelo BVDV induz uma resposta imune que, na maioria das

vezes, confere boa proteção contra a doença clínica em exposições posteriores (Dubovi, 1992; Bolin et al., 1988). Níveis de anticorpos neutralizantes são inicialmente detectados duas semanas após a infecção, aumentam até a décima segunda semana e declinam gradativamente.

A natureza da proteção, se humoral ou celular, ainda não é conhecida. No entanto, anticorpos neutralizantes parecem estar envolvidos na proteção a infecções subseqüentes e parecem ser eficazes em reduzir a transmissão do vírus ao feto (Dubovi, 1992). Diversas vacinas, vivas e inativadas, têm sido utilizadas para o controle da infeção (Dubovi, 1992), algumas dessas vacinas demonstraram-se eficazes na atenuação da doença clínica. No entanto, a eficácia de vacinas na proteção do feto tem sido discutida com resultados controvertidos publicados (Bolin et al., 1991; Dubovi, 1992). Trabalhos atuais relatam que, mesmo fêmeas prenhes imunizadas cinco meses antes da exposição ao vírus (durante a gestação foram expostas ao vírus aproximadamente no octogésimo segundo dia de gestação) ainda produziram 22 a 40% de animais PI (Zimmer et al., 2002). Além da grande diversidade antigênica existente entre os isolados clássicos de BVDV, o recente surgimento de cepas antigênicas distintas (BVDV tipo II) reacendeu a discussão em torno da eficácia de proteção pela vacinação (Pellerin et al., 1994). A variação antigênica é, em grande parte, responsável pela proteção insatisfatória conferida pela vacinação.

Sobre o BVDV tipo I, foram identificados, a princípio, dois subgenótipos distintos, BVDV I a e BVDV I b (Ridpath, 1998). Atualmente já são mais de onze subgenótipos diferentes para o BVDV I (Vilcek et al., 2001), sendo que mesmo dentre os subgenótipos já foram identificadas diferenças estruturais (Nagai et al., 2001). Doenças severas agudas são basicamente relacionadas com o BVDV tipo II, sendo relatado que a ocorrência dessas doenças é baixa, sendo a minoria dos casos, embora o BVDV II já ter sido isolado em todos os continentes e ser um tipo viral emergente. A maioria dos BVDV tipo II não são mais virulentos que os BVDV tipo I (Ridpath et al., 1994).

Trabalhos feitos atualmente indicam que o BVDV tipo II causa grandes alterações na função de agregação plaquetária, o que o diferencia, pelo menos

experimentalmente, do BVDV tipo I, sendo essa uma importante característica específica da virulência entre os dois tipos. Durante a infecção pelo BVDV tipo II, o vírus adere e destrói plaquetas. Um animal infectado por esse tipo viral possuirá menos de 10.000 plaquetas, sendo o normal 300.000, causando uma deficiência na função de coagulação, caracterizando a Síndrome Hemorrágica, que é a doença aguda de principal importância causada pelo BVDV tipo II.

Estudos recentes demonstraram que o BVDV tipo II possui subtipos, assim como o BVDV tipo I, sendo que alguns desses subtipos (23025 e 17583) são causadores de doenças mais severas que outros subtipos (713,5521 e 17011) (Kelling et al., 2002).

No Brasil, já foram identificados BVDV tipo II no sul do país, sendo esse achado epidemiologicamente relevante e devem ter importantes implicações para diagnóstico, estratégias de imunização e produção de vacinas (Flores et al., 2000).

Como conseqüência, a tipificação de isolados se constitui uma preocupação constante a partir da identificação das cepas do tipo II. Dois aspectos têm merecido especial atenção devido a sua relevância: a reatividade de isolados de BVDV com anticorpos monoclonais usados em diagnósticos e a extensão da proteção cruzada entre isolados do tipo I e do tipo II com relação a produção de vacinas polivalentes.

O uso de vacinas para a prevenção dessas doenças ainda é pouco difundido no Brasil, por serem essas vacinas de alto custo, além de pouco eficazes (pois são feitas a partir de amostras de outros países) e por desconhecimento dos prejuízos que essas doenças causam ao rebanho bovino.

A diarréia viral bovina tem distribuição mundial, sendo o primeiro surto diagnosticado ocorreu em março de 1946, nos EUA sendo que a primeira descrição do vírus ocorreu em 1954, nesse mesmo país (Baker et al., 1954).

Em países onde o vírus da Febre Aftosa já foi erradicado, o vírus da diarréia viral bovina é o principal causador de doença no rebanho bovino, levando a grandes prejuízos econômicos (Donis, 1995; Botton, 1998), pois é considerado um patógeno muito importante em relação às doenças reprodutivas. Os prejuízos causados pelo BVDV nos EUA são estimados em 400 milhões de dólares anuais. O impacto

econômico estimado da infecção nos países europeus assume proporções semelhantes (Houe, 1992).

Estudos dessa doença, em regiões endêmicas da Europa e EUA, apontaram prevalências de 70 a 80% nos animais adultos (Houe, 1992; Donis, 1995). Essa doença já foi também isolada em animais pertencentes à ordem *Artiodactila*, tais como suínos, caprinos, ovinos, bubalinos, inclusive uma variedade de ruminantes selvagens (Nettlenton, 1990; Sausker, E.A., 2002; Zupancic et al., 2002), que possivelmente são reservatórios da doença.

No Brasil, o primeiro isolamento viral ocorreu em 1993, no Rio Grande do Sul (Roech et al., 1995; Oliveria et al., 1996), porém a demonstração da infecção e relato da doença no Brasil, foram anteriores (Correa et al., 1968; Correa et al, 1972; Soares & Carvalho Pereira, 1974; Vidor, 1974; Muller et al, 1988).

Os dados sobre a infecção pelo BVDV no Brasil ainda são escassos, tendo sido baseados, sobretudo em relatos clínicos esporádicos (Correa et al., 1968; Correa et al, 1972; Soares & Carvalho Pereira, 1974; Vidor, 1974; Muller et al, 1988). A presença da infecção tem também sido descrita, através da detecção de anticorpos (Vidor, 1974; Castro, 1988; Castro et al., 1991) e de isolamento de vírus (Oliveira et al., 1993). Pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul, em Goiás e recentemente em Minas Gerais, apresentam resultados semelhantes aos observados nos EUA e Europa. Estudos preliminares no Brasil, na região do Rio Grande do Sul, apontaram uma prevalência de aproximadamente 60% , no estado de Goiás, através de soroneutralização, obteve-se 34,5% (Brito et al., 2002) e na região do triângulo mineiro, a prevalência foi de 55,8%, usando ELISA como teste diagnóstico (Mineo et al., 2002), não sendo os resultados muito diferentes dos encontrados mundialmente. (Canal et al., 1998). No entanto esses dados são esporádicos e não permitem uma avaliação da situação epidemiológica da infecção e da sua repercussão econômica na pecuária brasileira.

O desconhecimento da doença pelos produtores rurais, baixa taxa de diagnóstico clínico de BVDV e a falta de hábito do médico veterinário de campo em enviar material para diagnóstico em laboratório, devido à escassez de laboratórios

para o desenvolvimento desses exames, ocasionam a falta de informações sobre a doença no país. Esses problemas dificultam a elaboração de programas de controle e/ou erradicação do BVDV no país, o que seria de importância relevante para o desenvolvimento da pecuária nacional.

Objetivos

Realizar estudo sistemático da infecção pelo BVDV no rebanho bovino, detectando e caracterizando a presença do vírus da diarréia viral bovina em localidades da microrregião de Viçosa, através de estudos sorológicos do rebanho e isolamento viral em animais persistentemente infectados.

Isolamento viral de sangue fetal bovino coletado em matadouro de Ubá e frigoríficos da Grande Belo Horizonte, para caracterização da atividade viral.

Diagnóstico de BVDV através da técnica de Imunofluorescência Indireta.

Materiais e Métodos

Isolamento viral a partir de amostras de soro sangüíneo de fetos.

Foram coletadas na linha de abate de frigoríficos da cidade de Belo Horizonte e do matadouro de Ubá, 214 amostras de soro fetal bovino (os fetos apresentavam de 20 a 30 cm de comprimento). Nesses frigoríficos são abatidos animais de várias regiões do estado. No matadouro de Ubá são abatidos animais pertencentes às microrregiões de Viçosa e Ponte Nova.

No laboratório de Microbiologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, essas amostras foram processadas, sendo feito a separação do soro e posterior congelamento em nitrogênio líquido.

O sangue de fetos infectados intrauterinamente e imunotolerantes geralmente contém vírus livre ou associados aos leucócitos. O vírus pode ser isolado tanto da fração celular (capa flogística), como do plasma ou soro, já que estes usualmente não contêm anticorpos que possam interferir com o isolamento.

Para o desenvolvimento do isolamento foram cultivadas e usadas células Madin-Darby bovine kidney (MDBK, American Type Culture Collection CCL-22). As células foram mantidas em Eagle's minimum essential medium (MEM) (Gibco, Grand Island, NY), suplementado com 5% de soro eqüino, processado pelo próprio laboratório de Microbiologia Veterinária, UFV. As células foram cultivadas em

garrafas descartáveis de 25 cm^2, contendo MEM com sais de Earle's, suplementado com soro eqüino, sendo mantidas a 37^0C sob atmosfera de 5% de CO_2. Subculturas (passagens sucessivas das células com a finalidade de manutenção da viabilidade celular) foram produzidas retirando-se o meio de cultivo das garrafas que apresentavam uma monocamada celular completa. As células foram lavadas duas vezes com solução tampão salina fosfato (PBS), esterilizada, recebendo, em seguida, tratamento enzimático através da introdução de 0,5 ml de tripsina utilizada na forma de solução, e incubadas a 37^0C por 5 minutos. Após a desagregação da monocamada, as células dissociadas receberam rapidamente meio MEM suplementado com Soro Eqüino, com a finalidade de bloquear a ação da tripsina e evitar a citólise. As subculturas foram incubadas nas condições de temperatura e atmosferas de CO_2 descritas acima com a finalidade de formação de nova monocamada.

Foram preparadas placas para isolamento com células MDBK em placas de 96 poços. Após 24 horas da formação das monocamadas do cultivo celular, foram inoculados os soros para a tentativa de isolamento, em volume de 50 microlitros. As amostras foram colocadas em duplicata. Após três passagens, em intervalos de 72 horas, as placas foram tripsinizadas, e preparadas para a Imunofluorescência Indireta. Amostras dos soros a serem testados, foram inoculadas em células MDBK, em volume de 50 microlitros.

A inoculação de células de cultivo com células brancas do sangue e/ou soro/plasma e a demonstração de antígenos virais por imunofluorescência constitui-se em método padrão para isolamento de BVDV.

a) Imunofluorescência indireta

As células inoculadas com as amostras de vírus cepa Singer (BVDV tipo I e VS253 (BVDV tipo II) (Amostras padrão, gentilmente cedidas pela Equipe da Universidade Federal de Santa Maria e pelo pesquisador Dr. Ruben Donis da Universidade de Nebraska), que foram o controle positivo, amostras de soro fetal bovino, que foram o controle negativo e amostras de soro sanguíneo fetal coletadas em matadouro foram tripsinizadas, ressuspensas em 5 ml de MEM, colocadas em lâminas multispot até aderirem ao vidro por aproximadamente duas horas em estufa. Após duas horas, as lâminas com as células aderidas, foram fixadas em acetona fria (- 20^0C), por cinco minutos e secas ao ar.

Anticorpos monoclonais de camundongos específicos para a glicoproteína gp 53/E2 e gp48/E0 do BVDV (Corapi et al., 1990) e anticorpos contra a proteína não-estrutural p80 (Kreutz et al., 2000) como anticorpos primários e um anticorpo policlonal de cabra (específico para IgG de camundongo) conjugado com FITC (fluorescein isothiocyanate)(Sigma, Inc) como anticorpos secundários foram utilizados para o desenvolvimento dessa técnica. Incubações com os anticorpos primários por 30 min., a temperatura ambiente e lavadas em PBS e água por três minutos cada, em banho com suaves movimentos, posteriormente foram secas ao ar. Após esse primeiro tratamento, as células foram tratadas com anticorpos secundários por 30 minutos, em temperatura ambiente e lavadas como descrito. As lâminas, então, foram coradas com Evans Blue (0,01%) por um minuto, lavadas, secas e montadas com glicerol:PBS (1:1) e lamínula. Foram observadas em um microscópio de epifluorescência. Esse procedimento foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Animal

Soroneutralização

Amostras para a soroneutralização foram coletadas 315 de soro sangüíneo de animais adultos provenientes de propriedades de produção mista da microrregião de Viçosa. Essas propriedades foram selecionadas devido a facilidade de coleta de material e proximidade a Universidade. Participaram desse estudo doze propriedades rurais no total. Esses animais não haviam sido vacinados anteriormente contra BVDV. Depois de coletadas as amostras, foram processadas no laboratório da Microbiologia Veterinária e congeladas.

Foram testados pela prova de soroneutralização utilizando-se 100 $TCID_{50}$ (dose mínima infectante de cultivo celular capaz de destruir 50% dos cultivos celulares), conforme protocolo usado em estudos anteriores (Botton et al., 1998). A soroneutralização em células MDBK foi feita em placas de 96 poços, usadas para quantificar a neutralização viral por anticorpos para BVDV tipo I (Singer) e tipo II (VS253). Como controle positivo, foram utilizadas as amostras padrão Singer e VS253, como controle negativo, foi utilizado soro fetal bovino utilizado para cultivo celular.

As amostras de soro sangüíneo foram diluídas seriadamente na razão 2 e em seguida desafiadas em 100 $TCID_{50.}$ Foram incubadas à 37^0C por uma hora, previamente a adição de 10^4 células por poço. A leitura ocorreu após 96 horas de incubação, onde foi visualizada a presença de efeito citopático (negativo) ou ausência de efeito citopático (positivo) e qual a diluição que apresentava efeito para ser determinada a titulação.

Isolamento viral a partir de amostras de soro sangüíneo de bezerros de seis a dez meses.

Foram coletadas 171 amostras de sangue de animais de seis a dez meses em propriedades que foram positivas para a soroneutralização e propriedades vizinhas.

Esse material foi processado no Laboratório de Microbiologia Veterinária, onde o soro foi retirado e congelado em nitrogênio líquido.

As placas preparadas para isolamento com células MDBK foram de 96 poços. Após 24 horas da formação das monocamadas do cultivo celular, foram inoculados os soros para a tentativa de isolamento, em volume de 50 microlitros. As amostras foram colocadas em duplicata. Após três passagens, em intervalos de 72 horas, as placas foram tripsinizadas, e preparadas para a Imunofluorescência Indireta. Amostras dos soros a serem testados, foram inoculadas em células MDBK, em volume de 50 microlitros. Posteriormente foi desenvolvida no Laboratório de Virologia Animal, a técnica de Imunofluorescência Indireta, como descrito anteriormente.

Resultados e Discussões

Técnica de Imunofluorescência Indireta

Os resultados foram obtidos a partir da diluição seriada das amostras virais de cepas padrões. Os isolados utilizados foram a cepa citopática Singer, representando o tipo I e a cepa citopática VS253, representando o tipo II.

A técnica de imunofluorescência indireta permitiu a detecção de ambos tipos virais, confirmando os resultados descritos anteriormente para anticorpos monoclonais utilizados (Kreutz et al., 2000). O teste foi avaliado pela diluição seriada das suspensões virais estoques que variam de $10^{4,4}$ a $10^{6,2}$ $TCID_{50}$/mL. Esta técnica permitiu detectar concentrações de vírus em monocamadas de até 10 $TCID_{50}$/mL, esses resultados foram adequados e equivalentes aos descritos anteriormente.

A utilização dessa técnica permitiu detectar a presença de cepas virais não citopatogênicas, ou seja, cepas virais que não causam efeito citopático em cultivo celular. A presença da cepa viral não citopatogênica é a mais predominante em isolamentos como descrito previamente por Kreutz et al., (2000) e Fulton et al., (2002). Animais persistentemente infectados com cepas não citopatogênicas podem vir a apresentar a Doença das Mucosas, devido a uma mutação que ocorre nessa cepa, causando citopatogenicidade, que é relatada com quadros clínicos altamente fatais (McClurkin et al., 1985; Meyers et al., 1991; 1992), ou por uma infecção tardia

com outras cepas virais citopatogênica (Goyal et al., 2002).

Sabe-se da presença do vírus nos rebanhos brasileiros, mas particularmente na microrregião de Viçosa, não há relatos de casos clínicos da doença. Dessa maneira, no laboratório, tentou-se isolar a cepa não citopatogênica na região. De acordo com alguns relatos, pode haver quadro clínico inaparente de animais infectados com cepas não-citopatogênicas (Brownlie, 1991). A ausência de relatos clínicos é reforçada pela ausência de envio de material para diagnóstico laboratorial de rotina por parte dos médicos veterinários de campo, além de fatores como a baixa atividade viral e dificuldade no isolamento de animais persistentemente infectados.

Isolamento viral de soro sangüíneo de fetos coletados em matadouros.

Todos os trabalhos foram realizados em cultivo celular de células MDBK, em meio MEM com soro equino, pois esse seguramente é livre de BVDV, já que o BVDV é um contaminante de soros de fetos bovino, o que pode ocasionar contaminação de células susceptíveis, já que esse vírus é capaz de *in vitro*, contaminar várias linhagens celulares (Bolin et al., 1994; Bolin and Ridpath, 1998). Por isso foi feita uma cuidadosa manipulação desse material, fazendo também imunofluorescência nas células cultivadas no laboratório, além de nunca ter sido usada a capela após manipulação de soro fetal bovino, usado em outros cultivos celulares.

Um total de 214 amostras de soro sangüíneo coletado em matadouros, provenientes de diversas regiões do estado de Minas Gerais, foi negativo ao teste para detecção e isolamento do BVDV, nos mostrando a ausência de animais persistentemente infectados. Em trabalhos desenvolvidos no Rio Grande do Sul, uma baixíssima prevalência de animais persistentemente infectados foi encontrada, não ultrapassando 1% (Botton, S.A., et al, 1998).

Através de procedimentos de cultivo celular realizados para o isolamento de vírus a partir de amostras coletadas em matadouros, a presença do vírus citopático seria detectada através da observação do efeito viral nas células infectadas, o que

também não foi observado.

Sorologia

A soroneutralização identificou 14,3% de amostras positivas, para pelo menos uma das cepas virais padrão, do total de 315 amostras de soro testadas. Esses resultados são diferentes daqueles encontrados no Peru, que identificou 96% de animais soropositivos (Stahl et al., 2002). No estado do Rio Grande do Sul, num estudo onde foram utilizados 430 animais, a prevalência encontrada foi de 56%, similar aos encontrados nos Estados Unidos e Europa (Canal et al., 1998),

Os resultados obtidos nesse estudo conferem com estudos realizados na região de Asturias, na Espanha, A prevalência encontrada na região da Asturias foi de 21% (Mainar-Jaime et al., 2001) onde a forma de manejo e as propriedades são semelhantes com as verificadas nesse estudo. A soroprevalência em rebanhos não vacinados é diferente em vários países e até mesmo dentro de regiões do mesmo país, chegando a variar entre 20 a 90% (Mainar-Jaime et al., 2001), isso pode ser possivelmente explicado por diversidades de fatores, que podem ser densidade bovina, tamanho do rebanho, manejo, dentre outros.

Todas as amostras foram testadas primeiramente para o vírus BVDV tipo II, VS253, sendo que 45 amostras foram positivas. O vírus BVDV tipo II foi utilizado para uma seleção preliminar, pois estudos recentes relatam uma maior presença desse tipo de vírus nos rebanhos, sendo considerado esse tipo viral, forma emergente (Rush et al., 2001). Após esse primeiro teste, todas essas amostras positivas para BVDV tipo II, foram testadas para BVDV tipo I, Singer. Os resultados obtidos nessa soroneutralização foram 45 amostras positivas para BVDV tipo II e todas as 45 amostras também foram positivas para BVDV tipo I (Tab. 1).

Tabela 1 – Distribuição do número de animais positivos ao teste de soroneutralização segundo do número de propriedades testadas, microrregião de Viçosa, 2003.

Localidades	Animais positivos	% de Positivos	Total de animais
Cajurí	2	6%	32
Coimbra	11	25%	43
Coimbra	2	10%	20
Ervália	5	15%	34
Piau	6	16%	36
Piranga	12	57%	21
Teixeira	0	0%	8
Varginha	2	7%	41
Viçosa	3	7%	39
Viçosa	2	5%	41
Total	**45**	**14,3%**	**315**

Das localidades estudadas, a ocorrência variou de 0 a 57%. Apenas uma propriedade, Teixeiras, não apresentou animais reagentes, sendo essa descartada para tentativa de isolamento viral. A maioria das propriedades tiveram uma maior titulação para BVDV tipo II (fig 1), sendo um total 10 propriedades. Duas propriedades apresentaram maior titulação para BVDV tipo I, incluindo a que apresentou 57% de prevalência.

Observou-se que a maioria das amostras tinha maior titulação para o vírus tipo II, sendo a titulação acima de 1:128, num total de 15,5% de animais, o que aponta para uma exposição anterior a uma alta carga viral ou mesmo uma exposição recente ao vírus; essa maior titulação para o tipo II do BVDV foi relatada em estudos feitos nos EUA, onde a prevalência de BVDV tipo II foi de 50%, sendo o do BVDV tipo I de 18,2% (Rush et al., 2001; Evermann et al., 2002). Estudos feitos na Alemanha mostram uma prevalência maior para BVDV tipo II em certas regiões, sendo considerada um tipo variante emergente (Wolfmeyer et al., 1997; Tajima et al., 2001). As propriedades com maior número de animais positivo, apresentou titulação maior para o BVDV tipo I, o que pode estar associado com uma maior quantidade de

vírus presente nessas localidades, pois a titulação maior ou igual que 1:64 apresentou-se em 50% dos animais testados dessas propriedades.

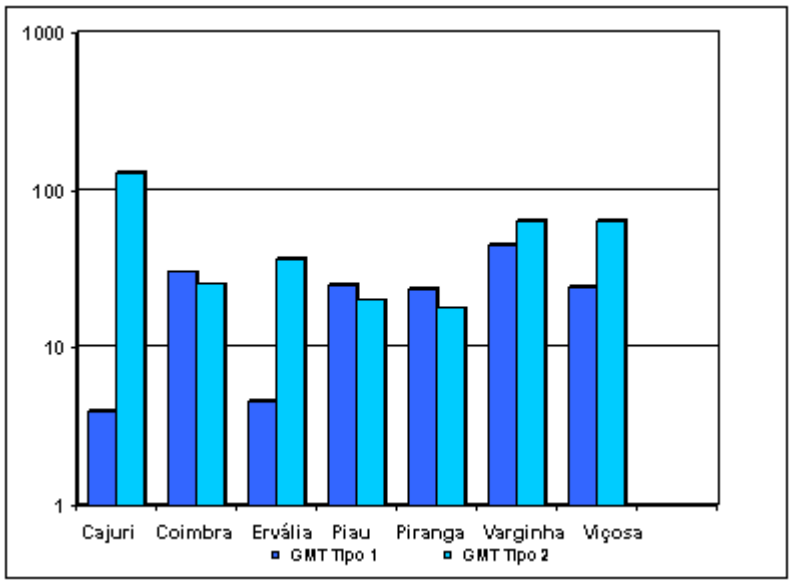

Fig 2 – Gráfico de distribuição de vírus da diarréia viral bovina tipos I e II, por localidades.

Não é possível distinguir entre a atividade viral recente e a imunidade adquirida ao longo da vida por esses animais testados. A baixa freqüência apresentada na região, de apenas 14,3%, aponta para uma baixa disseminação do vírus na região, provavelmente devido ao manejo desse rebanho leiteiro, onde a possível aquisição de animais contaminados ou até persistentemente infectados é muito baixa, devido à dinâmica de produção dessas propriedades que ocorre na microrregião de Viçosa.

Foi um total de 12 propriedades, região essa formada por pequenas propriedades familiares, produtoras de leite, onde geralmente os machos são descartados na época de desmama. A aquisição de animais é de baixa ocorrência, pois a reposição de fêmeas é feita com animais da própria propriedade e a aquisição de machos para a cobertura não é freqüente, pois os rebanhos são pequenos, não necessitando mais de dois touros, além disso, o uso de inseminação artificial com sêmen livre de doenças vem crescendo na região pelo próprio apoio da Universidade através do convênio PDPL (Programa de Desenvolvimento de Pecuária Leiteira).

A baixa prevalência em outros países está diretamente relacionada a campanhas públicas de controle e erradicação da doença, incluindo aí a vacinação sistemática dos rebanhos (Fulton et al., 2002).

Esses animais não haviam sido imunizados contra nenhum tipo de cepa do BVDV anteriormente. A importância de não terem sido expostos a imunização anterior, além de não permitir um falso diagnóstico da ocorrência do vírus na região, descarta a hipótese de uma exposição iatrogênica a esse vírus, pois em vacinas de IBR, nos EUA, houve contaminação por cepas de BVDV tipo II, o que levou a infecção e desenvolvimento de doença de vários animais (Falcone et al., 1999).

Isolamento viral a partir de amostras de soro sanguineo de animais de 6 a 10 meses.

Das doze propriedades estudadas anteriormente, foram selecionadas onze propriedades e propriedades vizinhas para a coleta de material. Em algumas dessas propriedades, pois o contato direto entre os rebanhos (divisão por cercas, pastos em comum (Valle et al., 1999) aumenta o risco de contaminação) para aumentar a probabilidade de isolamento, foram coletadas 171 amostras de soro sanguíneo de animais com idade de seis a dez meses de idade, para tentativa de isolamento viral de animais pertencentes a rebanhos sabidamente contaminados. Essa coleta foi feita de acordo com dados anteriores que observaram que devido a um declínio na imunidade passiva, animais nessa faixa etária estão mais susceptíveis a infecção pelo BVDV (Mickelsen and Evermann, 1994; Rush et al., 2001), e que o isolamento em animais nessa faixa etária é de 30 a 40% (Evermann et al., 2002). O contato direto com animais persistentemente infectados, provavelmente é o mais freqüente método de transmissão da infecção, embora estudos tenham demonstrado que a disseminação da infecção também ocorre na ausência desses animais.

As amostras foram submetidas à técnica de isolamento para detecção de animais persistentemente infectados. As amostras apresentaram-se todas negativas

para isolamento viral. Essa prática foi baseada na informação que o número de animais positivos para BVDV em propriedades onde o vírus circula, aumenta sensivelmente e pode chegar até 50% dos animais apresentando viremia (Wittum et al., 2001).

Não foram detectados animais persistentemente infectados ou animais sofrendo de infecção aguda em fase virêmica. Esses resultados podem ser amparados pelos resultados de pesquisadores em outros países (Wittum et al., 2001). No referido trabalho, em animais originários de propriedades produtoras de carne foi encontrada prevalência de animais persistentemente infectados entre 0 a 10%, quando coletados de animais aleatoriamente, ou seja, em propriedades sem histórico de doença associada à infecção pelo BVDV. Embora os rebanhos da microrregião de Viçosa tenham sido diagnosticados soropositivos para o BVDV tipo I e tipo II, os resultados de isolamento viral foram negativos. Sabe-se que os animais persistentemente infectados são a principal fonte de disseminação da doença, mas a ausência desses animais no rebanho, não descarta uma atividade viral presente no rebanho. Mecanismos de infecção na ausência desses animais ainda não foram totalmente elucidados, mas o contato com animais apresentando quadro agudo da infecção, contato com outras espécies infectadas com BVDV ou de forma iatrogênica são formas de infecção de importância ainda desconhecida (Ridpath et al., 2002).

Estudos feitos ao longo de 20 anos nos EUA apresentaram esse primeiro resultado em 1980, ou seja, baixa freqüência de animais persistentemente infectados ou em fase virêmica, < 5%, apesar das propriedades apresentarem a doença a campo, mas ao longo desse período, a dinâmica dessas infecções mudou, chegando a ser detectado aproximadamente 30% de animais PI, em 2000 (Evermann et al., 2002). Devido a este fato, estudos constantes, como um monitoramento sorológico deve ser acompanhado na microrregião de Viçosa para que se saiba adequadamente qual a dinâmica viral.

Conclusões e Perspectivas

Os resultados obtidos, 14,3% de ocorrência de animais soropositivos para o BVDV e ausência de isolamento viral, indicaram uma baixa atividade viral nessa microrregião de Viçosa. A dificuldade na detecção de animais portadores de BVDV pode indicar a possibilidade de uma avaliação superestimada do impacto desta infecção na população estudada. Entendemos que existe a necessidade de uma avaliação mais apurada nos aspectos econômicos relacionados com esta infecção e, ainda, nos programas de controle a serem adotados para mantermos esta infecção nos patamares encontrados no trabalho ou até mesmo erradicá-la.

Estudos posteriores, dessa mesma região, podem ser desenvolvidos analisando amostras de leite, para que se tenha uma noção exata da ação viral nos rebanhos leiteiros e para que se tenha uma maior abrangência de resultados.

Referências Bibliográficas

AFSHAR, A., G. C. DULAC, AND A. BOUFFARD (1989). Application of peroxidase labelled antibody assays for detection of porcine IgG antibodies to hog cholera and bovine viral diarrhea viruses *J Virol Methods*. **23**:253-61.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R.,KINSTON, R.E. et al (1989). Current protocols in molecular biology. *New York: Wiley.* v**. 1**, p. 491-94.

BAKER, J. A., York, C.J., Gillespie, J.H., Mitchell, G.B. (1954). Virus diarrhea in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **57**. 525-531

BASZLER, T. V., J. F. EVERMANN, P. S. KAYLOR, T. C. BYINGTON, AND P. M. DILBECK (1995). Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry *Vet Pathol*. **32**:609-18.

BAULE, C., M. VAN VUUREN, J. P. LOWINGS, AND S. BELAK (1997). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Res*. **52**:205-20.

BEAUDEAU, F., C. BELLOC, H. SEEGERS, S. ASSIE, E. SELLAL, AND A. JOLY (2001). Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Vet Microbiol*. **80**:329-37.

BECHER, P., M. KONIG, D. J. PATON, AND H. J. THIEL (1995). Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus *Virology*. **209**:200-6.

BIELEFELDT ,O.H .Experimental fetal infection with bovine viral diarrhea virus II (1982). Morphological reactions and distribution of viral antigen. *Can.J.Comp.Med*., **46**:363-369.

BIELEFELDT, O.H. BVD (1988a) Virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta. Vet. Scand*. **29**:77-84.

BIELEFELDT, O.H. (1990) Electron microscopy of bovine virus diarrhea virus. *Rev.Sci.Tech.O.I.E*., **9**:61-73.

BIELEFELDT, O.H. (1988b) In situ characterization of mononuclear leukocytes in skin and digestive tract of persistently bovine viral diarrhea virus-infected clinically healthy calves and calves with mucosal disease. *Vet. Pathol*., **25**:304-309.

BIELEFELDT, O.H., RONSHOLT, L., BLOCH, B.(1987) Demonstration of bovine viral diarrhea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J.Gen.Virol*., **68**:1971-1988.

BOLIN, S., MOENNIG, V., KELSO, G.N. (1988) Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. *Arch Virol*., **99**:117-118.

BOLIN, S.R. (1988) Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am.J.Vet.Res*., **49**:1040-1947.

BOLIN, S.R., LITTLEDIKE, E.T., RIDPATH, J.F. (1991). Serologic detection and pratical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea virus in a vaccinated herd. *Am.J.Vet.Res*., **52**:1033-1047

BOLIN, S.R., RIDPATH, J.F., BLACK, J. (1994) Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. *J.Virol.Methods*, 48:211-219.

BOTTON, S. A., A. M. DA-SILVA, M. C. BRUM, R. WEIBLEN, AND E. F. FLORES (1998). Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz. J Med Biol* Res. **31**:1429-38.

BOULANGER, D., DUBUISSON, J. AND PASTORET, P.P. (1992). Studies on the neutralization mechanism of bovine viral diarrhea virus. **IN: *Proc.Second Symposium on Pestivirus. Veyrier-du-Lac*, France, 1992.**157-161.

BRITO, W.M.E.D., SOUZA, W.J., VIEIRA, S., LINHARES, D.C.L., BARBOSA, A.C.V.C., ALFAIA, B.T. (2002). Serological study on bovine viral diarrhea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. *Virus Reviews Research*, **7**(pe4):144-145.

BROCK, K.V., DENG, R., RIBLET, S.M. (1992) Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J.Virol. Methods*, **38**:39-47.

BROWNLIE, J. (1985) Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *In Practice* **7**:195-207.

BROWNLIE, J (1990). The pathogenesis of bovine viral diarrhea virus infections. *Rev.Sci.Tech.,OIE*, **9**:43-59.

BRUM, M. C., C. F. SCHERER, E. F. FLORES, R. WEIBLEN, C. S. L. BARROS, AND I. M. LANGOHR (1999). Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2).

CANAL, C. W., I. HOTZEL, L. L. DE ALMEIDA, P. M. ROEHE, AND A. MASUDA (1996). Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT- PCR) *Vet Microbiol*. **48**:373-9.

CANAL, C. W., STRASSER , M, HERTIG C., MASUDA, A., PETERHANS, E.(1998). Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol*; **63**(2-4):85-97.

CASTRO, R.S. (1988). **Desempenho reprodutivo até 60 dias de gestação a doadoras de embriões bovinos, frente à infecção por diarréia bovina a vírus, herpesvírus bovino tipo1, leucose bovina e língua azul, em Minas Gerais.** Belo Horizonte:.93p. Tese Mestrado.

CASTRO, R.S.; MELO, L.H.E.; ABREU,S.R.D.; MUNIZ,A.M.M.; ALBUQUERQUE, A.P.S. (1991) Anticorpos contra pestivírus em soros bovinos do estado de Pernambuco**. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1991**, Belo Horizonte, MG. *Resumos... Colégio Bresileiro de Reprodução Animal*,.p. 278.

COLLEN, T., A. J. DOUGLAS, D. J. PATON, G. ZHANG, AND W. I. MORRISON (2000). Single amino acid differences are sufficient for CD4(+) T-cell recognition of a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus *Virology*. **276**:70-82.

COLLETT, M.S., ANDERSON, D.K., RETZEL, E. (1988c) Comparison of the pestivirus bovine viral diarrhea virus with members of the flaviviridae*. J. Gen. Virol*., **69**:2637-2643,.

COLLETT, M.S., LARSON, R., BELZER, S.K., RETZEL E (1988b). Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology*, **165**:200-208.

COLLETT, M.S., MOENNIG. V., HORZINEK, M. (1989) Recent advances in pestivirus research. *J.Gen.Virol*., **70**:253-266.

COLLETT, M.S., WISKERCHEN, M.A., WELNIAK, E., BELZER, S.K. (1991) Bovine viral diarrhea virus genomic organization*. Arch.Virol***.[suppl.3]:**19-27.

COLLINS, J. K., C. BRUNS, T. L. VERMEDAHL, A. L. SCHIEBEL, M. T. JESSEN, P. C. SCHULTHEISS, G. M. ANDERSON, R. P. DINSMORE, R. J. CALLAN, AND J. C. DEMARTINI (2000). Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpesvirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison *J Vet Diagn Invest*. **12**:406-11.

CORAPI, W.V.; DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. (1990) Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. *Am.J.Vet.Res*., **51**:1388-1394.

CORAPI, W.V.; FRENCH, T.W.; DUBOVI, E.J. (1989) Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J.Virol*.**62**:2823-2827.

CORREA,W. M.; GOTTSCHALK,A.F.; CORREA, C.; VASKE, T.R. (1972) Observações na diarréia a vírus nos bovinos do estado de São Paulo, v**.38**, p.145 - 147.

CORREA,W. M.; ZEZZA-NETO,C.; BARROS, H.M.; GOTTSCHALK,A.F. (1968) Nota Clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.**35**, p.141 - 151.

COUVREUR, B., C. LETELLIER, A. COLLARD, P. QUENON, P. DEHAN, C. HAMERS, P. P. PASTORET, AND P. KERKHOFS (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res*. **85**:17-28.

DA SILVA, N., R. ZARDOYA, G. SANTURDE, A. SOLANA, AND J. M. CASTRO (1995). Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhea virus genome in semen. *J Virol Methods*. **55**:209-18.

DEKKER, A., G. WENSVOORT, AND C. TERPSTRA (1995). Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays.*Vet Microbiol*. **47**:317-29.

DENG, R. AND BROCK, K.V. (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology*, **191**:867-876.

DONIS, R. AND DUBOVI, E.J. (1987b) Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. *Virology*, **158**:168-173.

DONIS, R. (1995) Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interaction with the host. *Vet.Clin.North.Am*.(in press).

DONIS, R., CORAPI, W., DUBOVI, E. (1991) Bovine viral diarrhea and their antigenic analyses. *Arch.Virol***.[Suppl 3]:**29-35.

DONIS, R.O. AND DUBOVI E.J (1987). Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus biotypes. *Am.J.Vet.Res*., **48**:1549-1554.

DONIS, R.O., CORAPI, W., DUBOVI, E.J. (1988) Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J.Gen.Virol*., **69**:77-86.

DONIS, R.O., DUBOVI, E.J. (1987a) Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells*. J.Gen.Virol*., **68**:1607-1616.

DUBOVI, E.J. (1992) Genetic diversity and BVD virus. *Comp*. *Immunol.Microbiol.Infect.Dis*., **15:**155-165.

ELAHI, S. M., S. H. SHEN, B. G. TALBOT, B. MASSIE, S. HARPIN, AND Y. ELAZHARY (1999). Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter . *Virology*. **261**:1-7.

ELAHI, S. M., S. H. SHEN, S. HARPIN, B. G. TALBOT, AND Y. ELAZHARY (1999). Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Arch Virol*. **144**:1057-70.

ELBERS K, TAUTZ N, BECHER P, STOLL D, RUMENAPF T, THIEL HJ. (1996) Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7.*J Virol*.;**70(6):**4131-5.

ENTRICAN, G., A. DAND, AND P. F. NETTLETON (1995). A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep .*Vet Microbiol*. **43**:65-74.

EVERMANN, J.F., RIDPATH, J.F. (2002). Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. *Vet.Microbiol*. 22;**89**(2-3):129-39.

FALCONE, E., TOLLIS, M., CONTI, G. (1999). Bovine viral diarrhea disease associated with a contaminated vaccine*. Vaccine*. 14;**18**(5-6):387-8.

FLORES, E. F., AND R. O. DONIS (1995). Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology*. **208**:565-75.

FLORES, E. F., L. H. GIL, S. A. BOTTON, R. WEIBLEN, J. F. RIDPATH, L. C. KREUTZ, C. PILATI, D. DRIEMEYER, V. MOOJEN, AND A. C. WENDELSTEIN (2000). Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet.Microbiol*. **77**:175-83.

FLORES, E. F., R. WEIBLEN, C. F. SCHERER, L. H. GIL, C. PILATI, D. DRIEMEIER, V. MOOJEN, AND A. C. WENDELSTEIN (2000). Identificaticão do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2) no sul do Brasil. *Pesq. Vet*. Bras. **20**:85-89.

FRANCKI, R., FAUQUET, C., KNUDSON, D., BROWN, F. (1991) Classification and nomenclature of viruses. Wien-New York: Springer-Verlag. Fifth Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).Vol.2 *Arch.Virol***.[Suppl.2]** Springer-Verlag, Vienna,N.York.

FRAY, M. D., E. A. SUPPLE, W. I. MORRISON, AND B. CHARLESTON (2000). Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals *J Gen Virol***. 81** Pt 7:1669-73.

FREDRIKSEN, B., C. M. PRESS, T. SANDVIK, S. A. ODEGAARD, AND T. LOKEN (1999). Detection of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus *Vet.Pathol*. **36**:267-75.

FULTON, R. W., AND L. J. BURGE (2000). Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. *Vaccine*. **19**:264-74.

FULTON, R. W., C. W. PURDY, A. W. CONFER, J. T. SALIKI, R. W. LOAN, R. E. BRIGGS, AND L. J. BURGE (2000). Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with Pasteurella spp., parainfluenza- 3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can. J. Vet. Res*. **64**:151-9.

FULTON, R.W., RIDPATH, J.F., SALIKI, J.T., BRIGGS, R.E., CONFER, A.W., BURGE, L.J., PURDY, C.W., LOAN, R.W., DUFF, G.C., PAYTON, M.E.(2002). Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease*. Can. J.Vet. Res.*;**66**(3):181-90.

GALIK, P. K., M. D. GIVENS, D. A. STRINGFELLOW, E. G. CRICHTON, M. D. BISHOP, AND K. J. EILERTSEN (2002). Bovine viral diarrhea virus (BVDV) and anti-BVDV antibodies in pooled samples of follicular fluid *Theriogenology*. **57**:1219-27.

GIL, L.H.V.G., BOTTON, S.A., WEIBLEN, R,. KREUTZ, L.C., TOBIAS, F.L., GARCEZ, D.C., FLORES, E.F. (1998). Antigenic and molecular characterization of newly identified Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type II. *Virus Reviews Research*, **vol 3 [suppl 1]**:43.

GOYAL, S.M., BOULJIHAD, M., HAUGERUD, S., RIDPATH, J.F. (2002). Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. *J Vet Diagn Invest*.;**14**(6):523-5.

GREISER-WILKE, I., FREY, H.R., BOTTCHER, J., LIESS, B., MOENNIG, V. (1993) Use of a modified antigen-capture enzyme immunoassay for the identification of virus persistence in cattle infected with bovine virus diarrhea (BVDV). *Tierarztl Prax*. Aug;**221**(4):302-5.

GRIGERA, P. R., M. P. MARZOCCA, A. V. CAPOZZO, L. BUONOCORE, R. O. DONIS, AND J. K. ROSE (2000). Presence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) E2 glycoprotein in VSV recombinant particles and induction of neutralizing BVDV antibodies in mice *Virus Res*. **69**:3-15.

GROM, J., AND D. BARLIC-MAGANJA (1999). Bovine viral diarrhoea (BVD) infections--control and eradication programme in breeding herds in Slovenia *Vet Microbiol*. **64**:259-64.

GROOMS D.L., KEILEN E.D., (2002). Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin Diagn Lab Immunol* Jul;**9**(4):898-900.

GRUMMER, B., M. BEER, E. LIEBLER-TENORIO, AND I. GREISER-WILKE (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus *J Gen Virol*. **82:**2597-605.

HAMEL, A. L., M. D. WASYLYSHEN, AND G. P. NAYAR (1995). Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay *J Clin Microbiol***.** **33**:287-91.

HARPIN, S., S. M. ELAHI, E. CORNAGLIA, R. H. YOLKEN, AND Y. ELAZHARY (1995). The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhea virus.*Arch.Virol*. **140**:1285-90.

HOUE, H. (1992) Age distribution of animals persistently infected with bovine virus diarrhea virus in twenty-two danish dairy herds. *Can.J.Vet.Res*., **56**:194-198.

HOLLAND, R. E., D. M. BEZEK, D. J. SPRECHER, J. S. PATTERSON, B. A. STEFICEK, AND A. L. TRAPP (1993). Investigation of an epizootic of bovine viral diarrhea virus infection in calves. *J.Am.Vet.Med.Assoc*. **202**:1849-54.

HORZINEK, M.C. (1981). Non-arthropod-borne togaviruses. *Academic Press, New York*. 200p.

HORZINEK, M.C. (1973) The structure of togaviruses*. Prog.Med.Virol*., **16**:109-156.

HOWARD, C.J. (1990) Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 95 - 104.

KELLING, C.L., STEFFEN, D.J., TOPLIFF, C.L., ESKRIDGE, K.M., DONIS, R.O., HIGUCHI, D.S. (2002). Comparative virulence of isolates of bovine viral diarrhea virus type II in experimentally inoculated six- to nine-month-old calves*. Am.J.Vet.Res.*;**63**(10):1379-84.

KOSMIDOU, A., R. AHL, H. J. THIEL, AND E. WEILAND (1995). Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins *Vet.Microbiol*. **47**:111-8.

KREUTZ, L. C., R. DONIS, L. H. GIL, M. LIMA, A. N. HOFFMAN, D. C. GARCEZ, E. F. FLORES, AND R. WEIBLEN (2000). Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus *Braz J.Med. Biol.Res*. **33**:1459-66.

LIEBLER-TENORIO, E. M., A. LANWEHR, I. GREISER-WILKE, B. I. LOEHR, AND J. POHLENZ (2000). Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD- viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease.*Vet.Microbiol*. **77**:163-74.

LIESS, B. AND MOENNIG, V. Ruminant pestivirus infections in pigs*. Rev.Sci.Tech.O.I.E*., **9:**151-161,1990.

LITTLEJOHNS , I.R. & HORNER, G.W. Incidence, epimiology and control of bovine pestivirus infections and disease in Australia and New Zealand*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*., **9**, 195 - 206, 1990.

LOVATO, L.T., WEIBLEN, R., RABUSKE, M. et al. (1995) Herpesvírus bovino tipo 1: isolamento de um caso de vulvovaginite*. Semina*, **v. 16, n. 1**.

MAINAR-JAIME, R.C., BERZAL-HERRANZ, B., AIRAS, P., ROJO-VAZQUEZ, F.A. (2001). Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from

the Asturias region of Spain. *Prev.Vet.Med*. 2;**52**(1):63-73.

MARSHALL, D. J., R. A. MOXLEY, AND C. L. KELLING (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Vet.Pathol.* **33**:311-8.

MARSHALL, D.J. (1993) Pathogenesis of primary acute bovine viral diarrhea virus infections in gnotobiotic calves. *Ph. D. Dissertation*, *University of Nebraska-Lincoln*, **159p**.

McCLURKIN, A.W., BOLIN, S.R., CORIA, M.F. (1985) Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J.Am.Vet.Med.Assoc*., **186**:568-575.

MEYERS, G., TAUTZ, N., DUBOVI, E.J (1991). Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology*, **180**:602-610.

MEYERS, G., TAUTZ, N., STARK, R. (1992) Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, **191**:368-376.

MICKELSEN, W.D., EVERMANN, J.F. (1994). In utero infections responsible for abortion, stillbirth, and birth of weak calves in beef cows. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*;**10**(1):1-14. Review.

MINEO, T.W.P., MONTASSIER, H.J., BJORKMAN, C., NASLUND, K., UGGLA, A. (2002). Seroprevalence of bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus type I in two abortion prone dairy herds in the Triângulo Mineiro region. *Virus Reviews Research*, **7(pe5):**145.

MOENNIG, V. AND PLAGEMANN, P.G. (1992) The pestiviruses. *Adv. Virus Res*., **41**,53-98.

MOENNIG, V. (1991). Pestiviruses: a review. *Vet.Microbiology*, **23**:35-54.

MORAES, M.P., WEIBLEN, R., FLORES, E.F. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. (no prelo)

MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; SAAD, U.M.; BARRETO, C.S.F.; CASTRO, L.C.; SIMONI, I.C.; OLIVEIRA, A.R. (1988). Isolation and identification fo bivine diarrhea virus mucosal desease (BVD-MD) from an outbreak in the state of São Paulo. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1988, São Lourenço, MG. *Resumos... Rio de Janeiro: Sociedade Brasielira de Virologia*,.258p. 80.

MYERS, T. M., V. G. KOLUPAEVA, E. MENDEZ, S. G. BAGINSKI, I. FROLOV, C. U. HELLEN, AND C. M. RICE 2001. Efficient translation initiation is required for

replication of bovine viral diarrhea virus subgenomic replicons *J Virol*. **75**:4226-38.

NAGAI, M., ITO, T., SUGITA, S., GENNO, A., TAKEUCHI, K., OZAWA, T., SAKODA, Y., NISHIMORI, T.., TAKAMURA, K., AKASHI, H. (2001). Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhea virus in Japan. *Arch Virol* **146**:685-689.

NETTLETON, P. F., AND G. ENTRICAN (1995). Ruminant pestiviruses *Br Vet J*. **151**:615-42.

NETTLETON, P.F. AND ENTRICAN, J.F. (1992). The diagnosis of ruminant pestivirus infections. Proc. of the Second Symposium of Pestivirus. *Veyrier du Lac*, France ,**185**-191.

NETTLETON, P.F. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev.Sci.Tech.O.I.E*., **9**:131-150,1990.

NUTTALL, P.A., LUTHER, P.D., STOTT, E.J. (1977). Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. *Nature*, **266**:835-838.

O'CONNOR, A., S. W. MARTIN, E. NAGY, P. MENZIES, AND R. HARLAND 92001). The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to bovine coronavirus and bovine viral diarrhea virus in 3 Ontario feedlots *Can J Vet Res*. **65**:137-42.

ODEON, A.C., FLORES, E.F. et al. (1994). Pathology of experimental BVDV type II strain infections in calves. *Conf. Res. World. Res. An. Dis*., Chicago, IL.

OLIVEIRA, J.G., OLIVEIRA, E.A S., SILVA, L.H.T. et al. (1993). Presença de Pestivirus em soros e cultivos celulares. Anais Virológica 93, Porto Alegre, p. 273.

PATON, D. J., K. H. CHRISTIANSEN, S. ALENIUS, M. P. CRANWELL, G. C. PRITCHARD, AND T. W. DREW (1998). Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales *Vet Rec*. **142**:385-91.

PATON, D. J., U. CARLSSON, J. P. LOWINGS, J. J. SANDS, S. VILCEK, AND S. ALENIUS (1995). Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep.*Vet.Microbiol***. 43**:283-94.

PELLERIN, C., S. MOIR, J. LECOMTE, AND P. TIJSSEN (1995). Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhea viruses *Vet.Microbiol*. **45**:45-57.

PELLERIN, C., VAN DEN HURK, J., LECOMTE, J (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, **203**:260-267.

POTTS, B.J., SAWYER, M., SHEKARCHI, I.C., WISMER, T., HUDDLESTON, D. (1989) Peroxidase-labelled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell cultures. *J.Virol.Methods*, **26**:119-124.

RADWAN, G. S., K. V. BROCK, J. S. HOGAN, AND K. L. SMITH (1995). Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhea virus *Vet Microbiol*. **44**:77-91.

REDDY, J. R., W. XUE, S. RIVERA, AND H. C. MINOCHA (1995). Antigenic differences between a field isolate and vaccine strains of bovine viral diarrhea virus *J Clin Microbiol***. 33**:2159-61.

RHODES, S. G., J. M. COCKSEDGE, R. A. COLLINS, AND W. I. MORRISON (1999). Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle *J Gen Virol*. **80**:1673-9.

RIDPATH, J. F., AND S. R. BOLIN (1995). Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV *Virology*. **212**:259-62.

RIDPATH, J. F., AND S. R. BOLIN (1995). The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV *Virology*. **212**:39-46.

RIDPATH, J. F., AND S. R. BOLIN (1998). Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes*. **12**:101-6.

RIDPATH, J., BOLIN, S., DUBOVI, E. (1994). Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into genotypes. *Virology*, **205**:66-74.

RIDPATH, J.F. AND BOLIN, S.R. (1992) Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhea using cDNA probes. *Mol.Cell.Probes*, **4**:26-36.

RIDPATH, J.F., LEWIS, T.L., BOLIN, S.R. (1991) Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic and cytopathic bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease. *J.Gen.Virol*., **72:**725-732.

RIDPATH, J.F., HIETALA, S.K., SORDEN, S., NEIL, J.D.(2002). Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhea infections*. J Vet Diagn Invest*. **14**(4):303-7.

RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MENDEZ, M.C. et al. (1983). Laboratório Regional de Diagnóstico. Relatório de atividades e doenças da área de influência no período de 1978-1982. Editora da Universidade, Pelotas.

ROEHE, P.M. AND EDWARDS, S. (1994). Comparison of pestivirus replication in cells of different species. *Res.Vet.Sci*., **57**:210-214.

RUSH, D.M., THURMOND, M.C., MUNOZ-ZANZI, C.A., HIETALA, S.K. (2001). Descriptive epidemiology of postnatal bovine viral diarrhea virus infection in intensively managed dairy heifers. *J Am Vet Med Assoc*. **219**(10):1426-31.

RWEYEMAMU, M.M.; FERNÁNDEZ , A.A.; ESPINOSA, A.M.; SCHUDEL, A.A.; LAGER, I.A. MUELLER, S.B.K. (1990). Incidence, epidemilogy and control fo bovine virus diarrhoea virus in South America. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*., **9**, 207 - 222.

SAUSKER E. A., Dyer, N.W. (2002). Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1and BRSV in ranch-raised bison (Bison bison). *J. Vet Diagn Invest*. Jan; **14 (1)**:68-70.

SCHELP, C., I. GREISER-WILKE, AND V. MOENNIG (2000). An actin-binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells *Virus Res*. **68**:1-5.

SCHELP, C., I. GREISER-WILKE, G. WOLF, M. BEER, V. MOENNIG, AND B. LIESS (1995). Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection *Arch Virol*. **140**:1997-2009.

SCHERER, C. F., E. F. FLORES, R. WEIBLEN, L. CARON, L. F. IRIGOYEN, J. P. NEVES, AND M. N. MACIEL (2001). Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus *Vet Microbiol*. **79**:285-99.

SCHMITT, J., P. BECHER, H. J. THIEL, AND G. M. KEIL (1999). Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions *J Gen Virol*. **80**:2839-48.

SHIMIZU, M. (1990) Current situation of bovine virus diahhhoea-mucosal disease (BVD-MD) virus infections and their antigenic diversity in Hokkaido, Japan. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*., **9**, 181 - 194.

SMITH, A. K., AND S. P. GRIMMER (2000). Birth of a BVDV-free calf from a persistently infected embryo transfer donor Vet Rec. **146**:49-50.

SOARES, L.A.; CARVALHO PEREIRA, D.A. (1974) Neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD) virus in cattle sera from São Paulo, Brazil. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **v.5**, p.1 - 5.

STAHL, K., RIVERA, H., VAGSHOLM, I., MORENO-LOPEZ, J. (2002). Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev Vet Med*. Dec 30;56(3):193-202.

TAJIMA, M., H. R. FREY, O. YAMATO, Y. MAEDE, V. MOENNIG, H. SCHOLZ, AND I. GREISER-WILKE (2001). Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, *Germany Virus Res*. **76**:31-42.

TERPSTRA, C., M. BLOEMRAAD, AND A. L. GIELKENS (1984). The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus *Vet Microbiol***. 9**:113-20.

THIEL, H-J., STARK, R., WEILAND, E., RUMENAPF, T., MEYERS, G. (1991). Hog cholera virus: molecular compositions of virions from a pestivirus*. J.Virol*., **65**:4705-4712.

TSUBOI, T., AND T. IMADA (1998). Detection of BVDV in bovine embryos derived from persistently infected heifers by PCR *Vet Rec*. **142**:114-5.

URUNO, K., I. SHIBATA, AND T. NAKANE (1998). Detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) using reverse transcription polymerase chain reaction assay *J Vet Med Sci*. **60**:867-70.

VALLE, P.S., WAYNE MARTIN, S., SKJERVE, E. (1999). A hierarchical trend model for bovine virus diarrhoea virus (BVDV) sero-conversion in Norwegian dairy herds from 1993 through 1997. *Prev Vet Med*. Oct 19;**47**(1-2):39-52.

VAN CAMPEN, H., P. VORPAHL, S. HUZURBAZAR, J. EDWARDS, AND J. CAVENDER (2000). A case report: evidence for type 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV)- associated disease in beef herds vaccinated with a modified-live type 1 BVDV vaccine *J Vet Diagn Invest*. **12**:263-5.

VAN GENNIP, H. G., P. A. VAN RIJN, M. N. WIDJOJOATMODJO, A. J. DE SMIT, AND R. J. MOORMANN (2000). Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E(RNS) or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response.*Vaccine*. **19**:447-59.

VIDOR, T. (1974). Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no estado do Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*, Porto Alegre, p.51 - 58.

VILCEK, S., PATON, D.J., DURKOVIC, B., STROINY, L., IBATA, G., MOUSSA, A., LOITSCH, A., ROSSMANITH, W., VEGAS, S., SCICLUNA, M.T., PAIFI, V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol*.;**146**(1):99-115.

VOGEL, F. S. F., C. F. SCHERER, E. F. FLORES, R. WEIBLEN, M. LIMA, AND C. F. KUNRATH (2001). Resposta sorológica e avaliacão de protecão fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) *Ciência Rural*. **31**:831-838.

WALDVOGEL, A. S., B. M. HEDIGER-WEITHALER, R. EICHER, A. ZAKHER, D. S. ZARLENGA, L. C. GASBARRE, AND V. T. HEUSSLER (2000). Interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus *Vet Immunol Immunopathol*. **77**:201-12.

WALZ, P. H., T. G. BELL, J. L. WELLS, D. L. GROOMS, L. KAISER, R. K. MAES, AND J. C. BAKER (2001). Relationship between degree of viremia and disease manifestation in calves with experimentally induced bovine viral diarrhea virus infection *Am J Vet Res*. **62**:1095-103.

WEILAND, E., AHL, R., STARK, R., WEILAND, F., THIEL, H-J. (1992).A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J.Virol*., **66**:3677-3682.

WEILAND, E., STARK, R., HAAS, B., RUMENAPF, T., MEYERS, G., THIEL, H.J. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies form part of a disulfide-linked heterodimer. *J.Virol*., **64**:3563-3569.

WENGLER G., WENGLER G., (1991). The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology*.;**184(2):**707-15.

WESTAWAY, E.G., BRINTON, M.A., GAIDAMOVICH, S.Y., HORZINEK, M.C., IGARASHI, A., LVOV, D.K. PORTERFIELD, J.F., RUSSEL, P.K., TRENT, D.W (1985). Flaviviridae Intervirology, **24**:183-192.

WHARTON, S.A., CALDER, L.J., RUIDROK, L.W.H., SKEHEL, J.J., STEINHAUER, D.A., WYLEY, D.C. (1995). Electron microscopyof antibody complexes of influenza virus hemagglutinin in the fusion pH conformation. *Embo J*., **14**:240-246.

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

XUE, W., AND H. C. MINOCHA (1996). Identification of bovine viral diarrhea virus receptor in different cell types *Vet Microbiol*. **49**:67-79

ZHIDKOV, S.A. & KHLENEV, Y.A. (1990). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease: prevalence, epizootiology and control measures inthe USSR. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*., **9**, 173-180.

ZIMMER, G.M., WENTINK, G.H., BRUSCHKE, C., WESTENBRINK, F.J., BRINKHOF, F., de GOEY, I. (2002). Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhea virus. *Vet Microbiol* 6;**89**(4):255-65.

ZUPANCIC, Z., Jukic, B., Lojkic, M., Cac, Z., Jemersic, L., Staresina, V. (2002). Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky`s disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*Jun;**49(5):**253-6.