

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA, MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CLÍNICA, PATOLÓGICA
E ECONÔMICA DE UM SURTO DE MORTALIDADE EM
BEZERROS POR “HOBI-LIKE VIRUS”, BRASIL.**

Raquel Aparecida Sales da Cruz

CUIABÁ-MT

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA, MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CLÍNICA, PATOLÓGICA
E ECONÔMICA DE UM SURTO DE MORTALIDADE EM
BEZERROS POR “HOBI-LIKE VIRUS”, BRASIL.**

Autora: Raquel Aparecida Sales da Cruz

Orientador: Prof. Dr. Edson Moleta Colodel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Medicina Veterinária, da Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ-MT

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S163c Cruz, Raquel Aparecida Sales da.
Caracterização molecular, clínica, patológica e
econômica de um surto de mortalidade em bezerros por
HoBi-like vírus, Brasil / Raquel Aparecida Sales da Cruz. --
2013
68 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Edson Moleta Colodel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato
Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Cuiabá, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Bovinos. 2. HoBi-like vírus. 3. Mortalidade. 4. RT-PCR.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Costa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 75060900 - CUIABÁ-MT
Tel.: +55 65 3615-6627 - Email: cpqvot@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Caracterização molecular clínica, patológica e econômica de um surto de mortalidade em bezerros por HoBi-like virus, Brasil"

AUTOR: Mestranda Raquel Aparecida Sales da Cruz

Dissertação defendida e aprovada em 19/02/2013.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador	Deonor(x)	Edson Moleta Colodel
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso		
Examinador Interno	Deonor(x)	Luciano Nakazato
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso		
Examinador Externo	Deonor(x)	Michele Lunardi
Instituição: Universidade de Cuiabá		
Examinador Suplente	Deonor(x)	Caroline Augusta Pissador
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso		

CUIABÁ, 19/02/2013.

□

A minha mãe pelo incansável incentivo,
amor e confiança, ao meu avô querido
fonte de amor e inspiração, ao meu Tio
Antônio por ter feito parte da minha vida,
a sua alegria e ensinamentos carregarei
comigo para sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a nossa senhora por me abençoarem sempre.

À minha mãe, pelo incentivo e confiança para que eu sempre esteja em busca de meus sonhos, pelo amor e por ser a melhor mãe que eu poderia ter.

A todos os meus familiares, meu avô, madrinha, tios e tias que sempre acreditaram em mim e me incentivaram. Em especial a minha “pima” Maria Luisa, ser iluminado que Deus colocou em minha vida.

À minha família de coração, Toledo de Oliveira, por estarem sempre em minha vida nos momentos em que mais precisei.

Ao Marcos pela amizade, companheirismo, paciência, carinho e por apoiar minhas escolhas... que assim seja.

Ao Prof. Edson Moleta Colodel por ter me orientado no Laboratório de Patologia Veterinária-LPV por todos esses anos e em especial nessa orientação tão fundamental e definitiva na minha vida.

À a Prof.^a Caroline Argenta Pescador pela orientação no LPV pelo incentivo e amparo nas horas em que precisei e pela co-orientação neste estudo.

Ao Prof. Marcos de Almeida Souza por todos os ensinamentos de patologia, suinocultura e histologia (etc..) partilhados e por ser um excelente professor.

A vocês mestres do LPV só posso agradecer a cada momento de aprendizado que tive por aqui nesses últimos anos e não foram poucos. E pelas oportunidades a mim concedidas de expansão do meu “horizonte patológico”.

À Prof.^a Alice e ao Prof. Amauri Alfieri por permitirem o processamento de minhas amostras no Laboratório de Virologia da UEL e aos colegas Wagner, Victor e Otonel pela fundamental e absoluta ajuda no processamento das mesmas.

À Laura Lopes de Almeida por compartilhar comigo sua experiência em virologia e me ajudar na interpretação de meus resultados, seus esclarecimentos foram vitais.

Aos companheiros de LPV fundamentais... por terem me aguentado por todos estes anos, sei que não foi fácil rsrs.

Ao Manoel (Manu) e a Gysele (Gy) pelas inúmeras lâminas, pela paciência e amizade. Aos colegas de pós-graduação Marconni, Flávio, Gustavo, Marciel, Fáber, Samara (Sâmar) e Giovanny pelo companheirismo e amizade.

Em especial ao Daniel (Dani) com quem aprendi muito, foram muito momentos de conversas e discussões de casos sempre pertinentes e a Letícia (Leh) minha companheira de LPV pelo aprendizado diário e pela amizade.

Aos estagiários que sobreviveram em especial a Camila pela ajuda imprescindível na minha rotina e projeto e ao Leonardo pela ajuda neste estudo.

À Nádia pelas aulas e livros emprestados, amizade e incentivo.

De vocês colegas de LPV... sentirei muita falta, mas estou apostando em um novo sonho. Levo comigo a saudade e orgulho de ter feito parte desse laboratório.

As minhas eternas amigas de LPV, a Laura por ter me incentivado a fazer estágio e ter me feito gostar de patologia e a Naiani pelas risadas sempre oportunas e pela amizade.

Aos meus amigos Evandro, Ricardo e Marcy pela amizade sincera para todo o sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma maneira contribuíram com esse estudo e/ou com meu aprendizado.

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.”

(Paulo Freire)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CLÍNICA, PATOLÓGICA E ECONÔMICA DE UM SURTO DE MORTALIDADE EM BEZERROS POR “HOBI-LIKE VIRUS”, BRASIL

“HoBi-like virus” ou pestivírus atípico já foi detectado em animais naturalmente infectados em três continentes, porém a doença clínica associada a infecção por HoBi-like virus ainda foi pouco estudada. No Brasil, a virose foi associada com aborto bovino e na Itália a lesões respiratórias. Neste trabalho relatam-se os aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos, moleculares e econômicos de um surto de infecção por HoBi-like pestivirus em bezerros com diarreia em uma propriedade localizada no município de Cuiabá/MT em 2010. Durante o surto morreram 20 bezerros na propriedade, dos quais foi possível acompanhar três animais. O bezerro 1 foi encaminhado ao Hospital Veterinário da UFMT para a necropsia. Outros dois bezerros (2 e 3) receberam acompanhamento no HOVET/UFMT e após a morte foram necropsiados. Quanto à história clínica, o bezerro 1 apresentou sinais de apatia, desidratação e diarreia amarelada durante 3 dias e na necropsia conteúdo amarelado no intestino, onfaloflebite e peritonite. Os Bezerros 2 e 3 apresentavam alopecia difusa no dorso, hiperqueratose epidermal, úlceras e erosões recobertas por placas de fibrina. A análise microscópica dos tecidos afetados evidenciou onfaloflebite e peritonite supurativa no Bezerro 1 e extensas áreas de necrose (úlceras e erosões) por diversos órgãos dos Bezerros 2 e 3. Para diagnóstico virológico foram colhidas amostras de sangue e órgãos linfóides dos bezerros 2 e 3, que foram, processados e submetidos a RT-PCR para BVDV. Produtos de amplificação da região 5' UTR e da nucleoprotease viral obtidos foram purificados e sequenciados. Análises filogenéticas das sequências, agora denominada amostra LPV-WR/BR11, permitiu sua classificação no grupo dos *Pestivirus atípicos*. A imuno-histoquímica para BVDV revelou a marcação positiva para proteína viral principalmente em células epiteliais da pele, da cavidade oral e dos órgãos do sistema digestório. Foi estimado um custo direto da doença no rebanho de R\$ 22.500,00. Os dados apresentados nesta caracterização demonstram que HoBi-like vírus pode causar mortalidade de bezerros por gastroenterite aguda associada a dermatite em bezerros lactentes.

Palavras-chave: Bovino, surto, *Pestivirus atípico*, RT-PCR, IHQ.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION, CLINICAL, PATHOLOGICAL AND MANAGEMENT OF AN OUTBREAK OF MORTALITY IN CALVES FOR-LIKE VIRUS HOBI-LIKE, BRAZIL.

"Hobi-like virus" or *atypical pestivirus* has been detected in animals infected naturally on three continents, but the clinical disease associated with infection Hobi-like virus has been little studied. In Brazil, the virus was associated with bovine abortion and respiratory lesions in Italy. In this paper we report the epidemiological, clinical, pathological, molecular and economics of an outbreak of infection Hobi-like pestivirus in calves with diarrhea in a property located in the city of Cuiabá / MT in 2010. During the outbreak killed 20 calves on the property, which was possible to follow three animals. The first calf was referred to the Veterinary Hospital of UFMT for necropsy. Two other calves (2:03) were monitored in HOVET / UFMTe were necropsied after death. Regarding the clinical history, the first calf showed signs of apathy, dehydration and diarrhea yellow for 3 days and at necropsy yellowish contents in the intestine, and peritonitis omphalophlebitis. 2:03 calves showed diffuse alopecia on the back, epidermal hyperkeratosis, ulcers and erosions covered with plates of fibrin. Microscopic examination of the affected tissues showed omphalophlebitis and suppurative peritonitis in 1 Calf and extensive areas of necrosis (ulcers and erosions) by various organs of calves 2:03. For virological diagnosis were sampled for blood and lymphoid organs of calves 2 and 3, which were processed and subjected to RT-PCR for BVDV. Products of amplification of the 5' untranslated region and viral nucleoprotease obtained were purified and sequenced. Phylogenetic analyzes of the sequences now denominated sample LPV-WR/BR11 allowed their classification in the group of atypical pestivirus. Immunohistochemistry for BVDV revealed positive staining for viral protein mainly in epithelial cells of the skin, oral cavity and the organs of the digestive system. We estimated a direct cost of the disease in the herd of R \$ 22,500.00. The data presented demonstrate that this characterization Hobi-like viruses can cause calf mortality for acute gastroenteritis associated dermatitis in suckling calves.

Keywords: Cattle, outbreak, atypical pestivirus, RT-PCR, IHC.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: (A) e (B):** Bovinos pertencentes a propriedade onde ocorreu o surto de infecção por HoBi-like vírus.....40
- Figura 2: Infecção por HoBi-Like virus. Bezerra 2. (A)** Apatia e anorexia. **(B).** Mucosa oral: Múltiplas úlceras na gengiva recobertas por placas de fibrina **(C)** diarreia profusa líquida de coloração enegrecida. **Bezerra 3. (D)** Mucosa oral com úlcera de aproximadamente 2 cm de diâmetro na gengiva.....41
- Figura 3. Infecção por HoBi-Like virus. Bezerra 3: (A) Plano nasal:** áreas de ulceração. **(B)** Hiperqueratose na região palmar. **Bezerra 2: (C) Mucosa oral: áreas de ulceração. (D) Esôfago:** Úlceras lineares na mucosa de coloração escura.....42
- Figura 4. Infecção por Hobi-Like virus. Bezerra 2. (A)** Apatia e anorexia. **(B).** Mucosa oral: Múltiplas úlceras na gengiva recobertas por placas de fibrina **(C)** diarreia profusa líquida de coloração enegrecida. **Bezerra 3. (D)** Mucosa oral com úlcera de aproximadamente 2 cm de diâmetro na gengiva.....44
- Figura 5. Técnica de imuno-histiquímica com anticorpo D89 (VRMD). Bezerra 1. (A)** Intestino delgado: citoplasma de enterócitos marcadas em vermelho. IHQ, obj. 40x. **Bezerra 2. (B)** Gengiva. Marcação em vermelho no citoplasma de células epiteliais, IHQ, obj. 40x. **Bezerra 3. (C)** Pele (narina). Marcação do citoplasma de células epiteliais. IHQ, obj. 40x. **(D)** Pele. Marcação do citoplasma de células epiteliais. IHQ, obj. 20x.....47
- Figura 6.** A análise filogenética da cepa LPV-UFMT/BR um fragmento de 428 pb das seqüências Npro de representantes selecionados de cada uma das espécies conhecidas do gênero Pestivirus. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining e Kimura dois parâmetros como um modelo de substituição de nucleótideos. Sequências utilizadas no alinhamento foram adquiridos a partir de GenBank.....49
- Figura 7.** A análise filogenética da cepa LPV-UFMT/BR um fragmento de 288 pb das seqüências 5'UTR de representantes selecionados de cada uma das espécies conhecidas do gênero Pestivirus. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining e Kimura dois parâmetros como um modelo de substituição de nucleótideos. Sequências utilizadas no alinhamento foram adquiridos a partir de GenBank.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais eventos históricos relacionados ao HoBi-like vírus.....	19
Tabela 2. Lesões macroscópicas bezerros infectados com HoBi-like.....	43
Tabela 3. Lesões histológicas observadas nos bezerros (B) necropsiados.....	45
Tabela 4. Distribuição e classificação da marcação imuno-histoquímica em órgãos coletados de 3 bezerros que morreram no surto de mortalidade em uma propriedade no Município de Cuiabá, MT, no período de abril a maio de 2011.....	46
Tabela 5. Titulação vacas e bezerros.....	51
Tabela 6. Custos diretos da infecção por HoBi-like vírus no rebanho.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comparação entre os diferentes testes de diagnóstico para BVDV.....29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CSFV	Vírus da peste suína clássica
RNA	Ácido ribonucleico
ORF	“open reading frame”
UTR	“untranslated regions”
Npro	autoprotease N-terminal
NCP	Não-citopático
CP	Citopático
PI	Persistentemente infectado
TI	Transitoriamente infectado
FCS	Soro fetal bovino
DM	Doença das Mucosas
RT-PCR	Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase
IHQ	Imuno-histoquímica
μ	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Histórico.....	16
2.2 Caracterização etiológica e morfológica.....	19
2.2.1 Características da família e gênero.....	19
2.2.2 Espécies.....	20
2.2.3 Biótipos	21
2.3 Epidemiologia.....	22
2.3.1 Diarreia Viral Bovina.....	23
2.3.2 Infecções por HoBi-like vírus.....	24
2.4 Patogenia e características clínico-patológicas.....	25
2.4.1 Diarreia Viral Bovina.....	25
2.4.2 Infecções por HoBi-like vírus.....	27
2.5 Diagnóstico Laboratorial.....	28
2.5.1 RT-PCR.....	29
2.5.2 IHQ.....	30
2.5.3 Isolamento Viral.....	31
2.5.4 Sorologia.....	32
2.6 Controle e Tratamento.....	33
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Procedimentos gerais.....	34
3.1.1 Necropsias e avaliação histológicas.....	35
3.1.2 Coleta de amostras de sangue e orelha.....	35
3.1.3 Imuno-histoquímica.....	36
3.1.4 Isolamento Viral.....	36
3.1.5 RT-PCR.....	37
3.1.6 Sequenciamento e análise filogenética	38
3.1.7 Soroneutralização.....	38
3.1.8 Avaliação econômica.....	38
4.0 RESULTADOS.....	39
4.1 Dados epidemiológicos.....	39
4.2 Análise clínico-patológica.....	40

4.3 Imuno-histoquímica.....	45
4.4 RT-PCR e análise filogenética.....	48
4.5 Soroneutralização.....	51
4.6 Análise econômica.....	52
5.0 DISCUSSÃO.....	53
6.0 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1. Introdução

A Família *Flaviviridae* possui três gêneros *Pestivirus*, *Flavivirus* e *Hepacivirus*. Pestivírus são mais importantes na veterinária porque apresentam distribuição mundial e podem infectar uma ampla variedade de espécies de animais. O maior impacto econômico tem sido atribuído a infecções em bovinos (GOENS 2002; RIDPATH 2005; RÜMENAPF AND THIEL 2008; PETERHANS et al., 2010a).

Atualmente, quatro espécies virais pertencem oficialmente ao gênero *Pestivirus*, BVDV (“bovine viral diarrhea virus” ou vírus da diarréia viral bovina) tipo 1, BVDV tipo 2, vírus da peste suína clássica (“classical swine fever virus” CSFV) e o vírus da doença da fronteira (“border disease virus” BDV) (VAN REGENMORTEL 2000; BECHER et al., 2003).

Adicionalmente, alguns isolados como vírus H138 de uma girafa no Kênia (BECHER et al 2003), o vírus Pronghorn isolado de um antílope nos Estados Unidos (VILCEK et al 2005), o vírus Bungowannah isolado de um surto de miocardite em suínos na Austrália (KIRKLAND et al., 2007) e os vírus chamados HoBi vírus, HoBi-like vírus, BVDV tipo 3 ou Pestivírus atípicos (SCHIRRMIEIER et al., 2004; LIU et al., 2009; BAUERMANN et al., 2013) são considerados como possíveis novas espécies pertencentes ao gênero.

HoBi-like vírus foi previamente diagnosticado em soro fetal bovino ou causando desordens reprodutivas e respiratórias em bovinos, semelhante à BVD (SCHIRRMIEIER et al., 2004; DECARO et al., 2011; DECARO et al., 2012a; BAUERMANN et al., 2012; BAUERMANN et al., 2013).

Desde a primeira descrição de HoBi-like vírus no mundo, diversos isolados foram caracterizados como sendo de origem brasileira, demonstrando uma ampla disseminação do vírus no Brasil (STAHL et al., 2005; BIANCHI et al.; 2010; BAUERMANN et al., 2013).

O presente trabalho descreve as características clínicas, patológicas, moleculares e econômicas de um surto de diarréia em bezerros lactentes associado HoBi-like vírus no Estado de Mato Grosso, Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Em 1946, OLAFSON e colaboradores descreveram pela primeira vez a doença diarreia viral bovina (BVD). Entretanto, foi apenas na década de 60 que a enfermidade foi associada ao vírus, denominado então vírus da BVD ou BVDV (JUBB et al., 1963).

Devido à necessidade de prevenir o surgimento de novos casos, ainda na mesma época, foi desenvolvida uma vacina viva para BVD, porém, isso proporcionou um aumento na ocorrência de vários surtos de Doença das Mucosas (DM), pois animais infectados por cepas não-citopáticas, ao serem vacinados com uma cepa vacinal citopática desenvolviam a doença (RIDPATH 2005).

A partir da década de 80 houve importantes descobertas relacionadas a produção de anticorpos monoclonais e ao sequenciamento do genoma do BVDV. O desenvolvimento de novos testes proporcionou melhorias no diagnóstico, contribuindo para o estudo da patogenia e da epidemiologia das infecções por *Pestivirus* (RÜMENAPF AND THIEL 2008). Na década de 90, surtos de diarreia com alta mortalidade de bovinos na América do Norte foram associados a cepas de BVDV altamente virulentas. Posteriormente essas cepas foram classificadas com subtipo viral e subsequentemente nova espécie viral, BVDV-2 (RIDPATH 2005).

Com a evolução das técnicas de diagnóstico, diversas cepas foram isoladas e caracterizadas como *Pestivirus*. Entretanto, sabe-se que essas cepas são genética e antigenicamente diferentes das espécies de *Pestivirus* oficialmente aceitas, sendo então classificadas como Hobi-like vírus ou *Pestivirus atípicos* (STAHL et al., 2010; BAUERMANN et al 2012).

A origem dos HoBi-like vírus ainda é pouco conhecida. Pesquisadores acreditam que o vírus seja originário de bovinos da América do Sul e que sua disseminação mundial ocorreu através de soro fetal bovino, vacinas ou outros produtos biológicos contaminados. Outra hipótese é que ele seja um vírus originado de búfalos da América do Sul e que tenha sido transmitido para bovinos, já que o primeiro possível isolado foi obtido de búfalos doentes (BAUERMANN et al., 2013). Desde a primeira identificação do HoBi-like vírus, diversos trabalhos foram realizados, sendo os principais eventos históricos sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais eventos históricos relacionados com o “HoBi-like virus”.

Ano	Contribuição	Referência
1990	Primeira detecção de <i>Pestivirus atípico</i>	BAUEMANN et al., 2013
2004	Primeira detecção de HoBi (Alemanha)	SCHIRRMAYER et al., 2004
2005	Detecção em um soro fetal bovino e búfalo (Suíça)	STALDER et al., 2005
2006	Detecção em dois fetos bovinos abortados (Brasil)	CORTEZ et al., 2006
2007	Detecção em um animal naturalmente infectado (Suécia)	STAHL et al., 2007
2009	Detecção em soro fetal bovino (Suécia)	LIU et al., 2009 ^a
2010	Detecção em soro fetal (Itália)	PELETTI et al., 2010
2011	Detecção em feto, sêmen e soro	BIANCHI et al., 2011
2011	Primeiro relato de surto de mortalidade (Itália)	DECARO et al., 2011
2012	Detecção em um feto (Itália)	DECARO et al., 2012 ^a
2012	Detecção de biótipos (Itália)	DECARO et al., 2012 ^b
2012	Detecção soro fetal bovino Austrália	XIA et al., 2012
2012	Detecção em meio MDBK (China)	MAO et al., 2012
2013	Comprovação da infecção persistente	DECARO et al., 2013

2.2 CARACTERIZAÇÃO ETIOLÓGICA E MORFOLÓGICA

2.2.1 Características do gênero

O gênero *Pestivirus* possui RNA de cadeia simples de polaridade positiva. O genoma de 12,5 kb. Quanto a organização genômica, possui uma única fase de leitura aberta (ORF “open reading frame”) e duas regiões não traduzidas UTRs (“untranslated regions”). A região 5’UTR possui aproximadamente com 360 a 390 bases e a 3’UTR apresenta aproximadamente 240 bases. A região 5’ UTR é a região mais conservada do genoma dos *Pestivirus* (LINDENBACH et al., 2007; RÜMENAPF and THIEL 2008).

A ORF codifica uma única poliproteína de 3988 aminoácidos, esta poliproteína é processada por proteases virais e celulares em 11 ou 12 proteínas maduras,

durante e após a tradução. Os produtos destas clivagens são: autoprotease N-terminal (Npro), proteína do capsídeo (C), proteínas do envelope (Erns, E1e E2) e proteínas não-estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). (RIDPATH 2005; LINDENBACH et al., 2007; RÜMENAPF and THIEL 2008; NIELL 2012).

Das proteínas que os *Pestivirus* codificam duas são específica ao gênero; a Npro que é uma autoproteína que faz a primeira clivagem do peptídeo viral e a Erns uma glicoproteína solúvel que possui um papel de RNase intrínseca. Os pestivírus são esféricos e variam de 40 a 60 nm possuem um capsídeo rodeado por uma bicamada lipídica que tem três proteínas estruturais a E1, E2 e a Erns (RÜMENAPF and THIEL 2008).

Vírus RNA apresentam de altas taxas de mutações e recombinações gênicas, isto confere a estes vírus alta capacidade de adaptação ao hospedeiro e favorecimento a evasão do sistema imune do mesmo (RIDPATH et al., 2003, GOENS 2002). A replicação do RNA viral ocorre no citoplasma da célula hospedeira, as partículas virais são montadas, envoltas por membrana plasmática, transportados em vesículas citoplasmáticas através de via de secreção das células e liberadas por exocitose (RIDPATH 2005).

Vírus do gênero *Pestivirus* são os únicos da família *Flaviviridae* que são estáveis em um pH baixo e a capa lipídica é dissolvida por solventes orgânicos (RIDPATH 2005).

2.2.2 Espécies virais

A análise da região 5'UTR permite a diferenciação entre as principais espécies de *Pestivirus* que acometem ruminantes, principalmente bovinos. Existem duas espécies distintas de BVDV, 1 e 2 (RIDPATH et al., 1994). Dentro da espécie viral, as cepas virais podem ser divididas em genótipos e subgenótipos e existe grande variabilidade dos tipos virais prevalentes nas populações bovinas (RIDPATH, 2005).

Nos Estados Unidos, há uma maior prevalência de isolados BVDV-1a, BVDV-1b e BVDV-2a (FULTON et al., 2000; FULTON et al., 2005; TAJIMA & DUBOVI 2005; FULTON et al., 2009b). Na Europa são mais prevalentes BVDV-1 e BVDV-2 é menos frequente (VILCEK et al., 2001; RIDPATH 2005; Stalder et al., 2005,). No Brasil, FLORES et al., 2005, demonstraram que a maioria dos isolados

caracterizados pertenciam ao genótipo BVDV-1, embora isolados de BVDV-2 tenham sido observados. Posteriormente, em um estudo complementar, CORTEZ et al. (2006) verificaram que a maior parte desses isolados brasileiros se classificava como BVDV-1a, enquanto a maioria das amostras BVDV-2 foram agrupadas como BVDV-2b.

A classificação de HoBi-like vírus ainda não foi bem estabelecida, alguns autores sugerem que ele seja um terceiro genótipo denominado de BVDV tipo 3 (LIU et al., 2009), porém essa classificação não é bem aceita devido a variabilidade antigênica entre o HoBi-like e outras espécies de BVDV. STAHL et al., 2010 propõem a divisão em dois grupos de acordo com a origem do isolado; um grupo de origem brasileira relacionada a primeira detecção por SCHIRMEIER et al., 2004 e outro de origem tailandesa identificado por STAHL e colaboradores (2007).

2.2.3 Biótipos

Pestivirus também podem ser divididos em dois biótipos, sendo eles, citopáticos (CP) e não-citopáticos (NCP) que são distinguidos de acordo com seu efeito em cultura de células. Os vírus NCP não induzem a apoptose celular enquanto que os CP induzem. A diferenciação entre biótipos é uma característica viral que ocorre devida uma mudança no processamento da proteína não-estrutural viral NS2-3, que sofre uma clivagem dando origem a NS2 e NS3, sendo que cepas CP são normalmente originadas de cepas NCP (RIDPATH 2005, RÜMENAPF and THIEL 2008).

Os estudos desenvolvidos por LACKNER et al., 2004 e LACKNER et al., 2005, descrevem que nas primeiras horas após a infecção da célula hospedeira pelo vírus da BVD ocorre a clivagem quase total da proteína NS2-3 em NS2 e NS3. Esse processo diminui e fica quase que indetectável em cepas NCP, diminuindo moderadamente em cepas CP. A NS2 é uma protease que tem papel fundamental na geração de cepas NCP e CP, também regula as taxas de replicação do vírus que estão diretamente ligadas a quantidade de NS3, influenciando a patogenicidade viral (NEILL et al 2012).

NEILL e colaboradores (2012b) demonstraram que as alterações nucleotídicas virais são de 2,3 a 8 vezes maiores em fêmeas prenhas infectadas com BVDV quando comparado com fêmeas não prenhas com a infecção aguda.

A maioria das cepas de campo isoladas de pestivírus são NCP (BECHER et al., 1996; RIDPATH et al., 2003; RIDPATH 2005, RIDPATH & FLORES 2007; GALLEI et al., 2008; PETERHANS et al., 2010b). As cepas NCP são responsáveis por originar animais persistentemente infectados (PI) ou transitoriamente infectados (TI). Diferente disso, cepas CP causam somente infecções transitórias (PETERHANS et al., 2010b).

Animais PI em média representam 1% da população de bovinos (HOUE 1999). DECARO et al., 2013 descreveram pela primeira vez a infecção persistente por HoBi-like vírus.

Todavia, cepas NCP altamente virulentas também podem causar infecções agudas em animais adultos (HAMERS et al., 2001; RIDIPATH et al., 2006; FLORES et al., 2007; LUNARDI et al., 2008; SANTOS et al., 2011; COLLOFF et al., 2012).

Recentemente, foi relatado a presença de uma cepa citopática do vírus HoBi-like em um surto de doença respiratória (DECARO et al., 2012b). Cepas CP estão relacionadas a uma forma aguda e letal denominada Doença das Mucosas (DM) em bovinos por BVDV (BECHER et al., 1996; RIDIPATH et al., 2005; RIDIPATH & FLORES 2007). Porém Cepas citopáticas e não-citopáticas de HoBi-like vírus também foram isoladas em pulmões de animais que morreram em um surto de doença respiratória na Itália (DECARO et al., 2012b).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Pestivirus são encontrados em todo mundo e podem infectar diferentes espécies de animais domésticos (bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, suínos) e animais selvagens ungulados (BECHER et al., 2003) como girafa, antílope e cervo (POTIGIETER 2004; EVERMANN 2006; VILCEK & NETTLETON 2006; RÜMENAPF & THIEL 2008; PASSLER & WALZ 2009; BYERS et al., 2011).

A doença pode ser letal dependendo da patogenicidade da cepa viral responsável pela infecção ou pode ser assintomática como acontece na maioria das infecções a campo (PETERHANS et al., 2010a). Porém infecções agudas em ruminantes são menos frequentes que infecções transitórias, sendo que a última gera imunidade a futuras infecções (CHASE et al., 2004).

Pestivirus podem causar infecção transitória ou persistente. Os animais persistentemente infectados (PI) têm papel fundamental na manutenção e

disseminação do vírus dentro do rebanho e entre rebanhos. Bovinos PIs são raros e originados de uma infecção viral do feto via transplacentária que ocorre no terço inicial da gestação de uma vaca suscetível, não imune a infecção viral (HOUE 1999, PETERHANS et al., 2010).

2.3.1 Diarreia Viral Bovina (BVD)

A BVD é responsável por causar expressivo impacto econômico e gerar uma grande variabilidade de sinais clínicos em ruminantes (gastroentéricos, respiratórios e reprodutivos) o que dificulta o diagnóstico e o consequente tratamento ou prevenção (HOUE et al., 1999; GOENS et al., 2002; RIDPATH et al., 2005).

A doença é considerada endêmica na maioria das criações comerciais de bovinos, pode ser transmitida verticalmente ou horizontalmente, causando infecções transitórias (TI) ou infecções persistentes (PI). Os animais PI excretam constantemente grande quantidade de partículas virais por secreções vaginal, nasal, oral, placenta, sangue, sêmen e leite e em menor proporção por urina e fezes (HOUE 1999; LINDBERT et al., 2004; POTGIETER 2004; THURMOND 2005; RIDPATH 2005, RADOSTITS et al., 2007). Portanto facilitando a transmissão entre rebanhos, principalmente através da movimentação desses animais (LINDBERG et al., 1999), enquanto que o TI excreta uma baixa quantidade por menor período (HOUE 1999; GOENS 2002; LINDBERG et al., 2006).

A prevalência da infecção dentro dos rebanhos vai depender principalmente de medidas de manejo adotadas como compra de animais, manejo reprodutivo e vacinação (HOUE 1999). A prevalência de PI pode variar entre rebanhos de 0,1 a 1,5% (TAYLOR et al., 1995; HOUE 1999; GROM et al., 1999).

HOUE (1999) descreve que em confinamentos, um animal PI pode infectar mais de 90% do rebanho antes de alcançar 3-4 meses, enquanto que em criações extensivas a taxa de transmissão é mais lenta. RODINING et al., 2012 demonstraram através de experimento que a introdução de um animal PI em um rebanho, 50 dias antes da estação de monta, não traz prejuízos a reprodução, pois os animais adquirem imunidade ativa e desenvolvem proteção a futuras exposições á campo.

O BVDV pode sobreviver no ambiente por semanas, assim animais susceptíveis podem ser infectados também quando expostos a alimentos ou

equipamentos (agulhas ou material cirúrgico contaminado, luvas de palpação, tatuadores e aplicadores de brinco) previamente utilizados por animais PI e/ou por animais com infecção aguda (THURMOND 2005).

Há também a probabilidade de transmissão de partículas virais através de aerossóis, principalmente em casos de bezerros infectados pelo BVDV-1 apresentando a forma respiratória da doença (BAULE et al., 2001), bem como através de vacinas vivas modificadas (THURMOND 2005). A transmissão vetorial por moscas hematófagas é possível, já que o BVDV foi isolado em moscas como a *Muscae autumnali* e a transmissão foi reproduzida experimentalmente, utilizando-se as espécies *Stomoxys calcitrans*, *Haematopota pluvialis* e *Hydrotaea irritans*, após repasto forçado por 10-15 minutos em um animal PI (EDWARDS 1991; THURMOND 2005).

2.3.2 HoBi-like vírus

HoBi-like vírus foi detectado em lotes de soro fetal bovino contaminado (SCHIRMEIER et al., 2004; LIU et al., 2009a; PELETTI et al., 2010; XIA et al., 2012), em animais naturalmente infectados durante levantamentos sorológicos e diagnóstico em sangue e sêmen no Brasil (STALDER et al., 2005; STAHL et al., 2007, BIANCHI et al., 2011), mas houveram também isolados associados a apresentação clínica, como abortos e doença respiratória grave (CORTEZ et al., 2006; DECARO et al., 2011; DECARO et al., 2012b). Esses isolados foram encontrados em três continentes (América do Sul, Europa e Ásia).

Posteriormente houve a reprodução experimental em bovinos, ovinos e suínos da doença (DECARO et al., 2012c). Estudos realizados por LARSKAN et al., 2012 a partir da inoculação de cepa altamente virulenta de BVDV e HoBi-like vírus demonstraram que a apresentação dos sinais clínicos nos animais inoculados com o vírus foi mais branda quando comparada com às infecções naturais.

Acredita-se que a principal forma de disseminação deste vírus ocorra através da contaminação de lotes de soro fetal bovino. Segundo MARTIN 2012, acredita-se que 30% do soro fetal bovino originários da América do sul que são testados na Europa são positivos para o HoBi-like vírus (BAUERMAN et al., 2013), caracterizando um grave problema de biossegurança em insumos biológicos como vacinas e kits diagnósticos, que podem tornar-se vias de transmissão do vírus

(STALDER et al., 2005, STAHL et al., 2007; LIU et al., 2009a; PELETTTO et al., 2010; XIA et al., 2012). Recentemente, comprovou-se uma infecção persistente indicando que animais PI por vírus HoBi-like (DECARO et al., 2013).

Acredita-se que o Brasil, Itália e Tailândia sejam regiões endêmicas de infecção pelo HoBi-Like causando assim, grandes perdas econômicas devido a variabilidade de sinais clínicos apresentados (respiratórios, reprodutivos) comprometendo assim o comércio internacional de animais e produtos de origem animal destes países (BAUERMANN et al., 2013).

2.4 PATOGENIA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Dependendo da cepa isolada, da espécie animal afetada e da interação agente hospedeiro, as infecções por agentes deste gênero podem ocasionar sinais clínicos altamente letais e/ou subclínicos (VILCEK et al., 2006; RÜMENAPF & THIEL 2008; PETERHANS et al., 2010).

2.4.1. Diarreia Viral Bovina

A principal porta de entrada do BVDV é a oronasal (BAKER 1995; RIDIPATH et al., 2005; RIDPATH & FLORES 2007; LIEBLER-TENORIO 2005), iniciando com uma replicação do vírus na tonsila palatina, disseminando para linfonodos adjacentes, timo e placas de Peyer, neste período eleva-se a altos títulos de anticorpos por até 6 dias após a infecção. Essa replicação ocorre principalmente em linfócitos, mielócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, o que justifica a marcada imunossupressão (LIEBLER-TENORIO 2004).

Embora a infecção por BVDV possa gerar diversos quadros clínicos, as maiores perdas econômicas estão associadas a problemas reprodutivos. (HOUE 1999). A infecção intra-uterina do BVDV em fetos de fêmeas soronegativas pode resultar em diversos quadros clínicos dependendo do período de gestação (GROOMS 2004; GROOMS & GIVENS 2005; GROOMS et al., 2006). Dentre os quadros clínicos ressalta-se a baixa taxa de concepção, morte embrionária e disfunção ovariana (GROOMS 2004; LIEBLER-TENORIO 2005).

A infecção do feto gera os maiores impactos econômicos (FLORES & SCHUCH 2007). Não se sabe exatamente o mecanismo pelo qual o vírus

ultrapassa a barreira placentária, mas acredita-se que as lesões vasculares ocasionadas permitem a entrada do vírus (FREDRIKSEN et al., 1999). As infecções entre os 40 e 120 dias de gestação dão origem aos animais PIs, porém podem gerar morte fetal, aborto, mumificação e em menor escala anomalias (GROOMS 2004; GROOMS & GIVENS 2005; GROOMS et al., 2006).

As malformações ocorrem normalmente em infecções entre 100 a 150 dias de gestação, devido provavelmente a morte celular e resposta inflamatória. Dentre as malformações, as mais comuns são hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, hipomielogênese, hipoplasia pulmonar e artrogripose (GROOMS 2004; GROOMS & GIVENS 2005; EVERMANN & BARRINGTON 2005).

Os fetos que não desenvolvem sinais clínicos após infecção por cepas não-citopáticas entre 40 e 120 dias de gestação tornam-se persistentemente infectados (PI). Estes animais são imunotolerantes aos componentes estruturais do pestivirus (GROOMS 2004). Na maioria das vezes, os animais PI nascem clinicamente saudáveis, eventualmente podem ser fracos ou ter malformações (POTIGIETER 2004; LIEBLER-TENORIO 2005), porém morrem nos primeiros meses de vida por infecções secundárias (RIDPATH & FLORES 2007). Os fetos que entram em contato com o vírus entre 128 e 285 dias de gestação têm infecções transitórias e podem vir a termo (POTIGIETER 2004).

A forma aguda da infecção pelo BVDV em animais não-prenhes pode resultar em diferentes manifestações clínicas, dependendo de sua virulência e do status imune do animal. Entretanto, estudos demonstram que 70 – 90% das infecções pelo BVDV são subclínicas (HAMERS et al., 2001). Infecções causadas por cepas virais de baixa virulência, afetam principalmente animais de 6 a 12 meses de idade. Na maioria dos casos são autolimitantes e apresentam alta morbidade com mortalidade baixa ou inexistente (HAMERS et al., 2001; FLORES & SCHUCH 2007).

Surtos com alta mortalidade em casos de infecções por cepas altamente virulentas do BVDV tipo 1b e BVDV tipo 2 (HAMERS et al., 2001; RIDPATH et al., 2006; FLORES et al., 2007; LUNARDI et al., 2008; HESSMAN et al., 2012) podem ocorrer. Os sinais clínicos apresentados são severos e semelhantes aos apresentados em casos de doença das mucosas (FLORES et al., 2000; RIDPATH et al., 2006; FLORES et al., 2007; LUNARDI et al., 2008).

A apresentação clínica de Doença das mucosas (DM) é consequência da infecção de um animal PI por uma cepa CP BVDV, homologa a cepa NCP que gerou

a infecção persistente. Acredita-se que haja uma mutação na cepa NCP gerando uma cepa CP (POTIGIETER 2004). A DM pode ser dividida em aguda e crônica, a primeira caracteriza-se pelo aparecimento rápido dos sinais clínicos (2-21) em animais de 6-24 meses e na crônica o curso da doença pode chegar a 18 meses (POTIGIETER, 2004).

Os sinais clínicos são semelhantes para as duas apresentações sendo caracterizados por diarreia intermitente, hipertermia, anorexia e taquicardia. Macroscopicamente são visualizadas áreas de úlceras e erosões na mucosa oral e por todo o sistema digestório caracterizadas por extensas áreas de necrose recobertas por fibrina. Há também alopecia na pele e hiperqueratose na região dos dígitos e região naso-labial.

Microscopicamente observam-se extensas áreas de necrose por todo trato digestório e centros foliculares. Na pele há áreas de necrose associada à formação de crostas (POTIGIETER 2004). Estudo desenvolvido por HILBE et al., 2013 demonstrou que a via intrínseca da apoptose celular é um elemento chave na patogênese da DM, mas não se sabe ainda os mecanismos pelos quais isso ocorre nem qual o papel do vírus nesse processo.

Alguns animais podem apresentar também síndrome hemorrágica caracterizada por trombocitopenia normalmente em infecções por cepas virulentas de BVDV-2 (LEIBLER-TENORIO et al., 2004), e raramente é relacionada ao BVDV tipo 1 (COLLOFF et al., 2012).

2.4.2 Infecções por HoBi-like vírus

A maioria dos isolados de HoBi-like são de amostras de soro fetal bovino (SCHIRRMIEIER et al., 2004, STAHL et al., 2007, LIU et al., 2009a, PELETTTO et al., 2010, XIA et al., 2012) porém há dois isolados de animais naturalmente infectados (STALDER et al., 2005, STAHL et al., 2007).

Acredita-se que a primeira amostra isolada foi a BRZ buf 9 provinda de um búfalo doente em 1990 (STALDER et al., 2005; BAUERMANN et al., 2013), posteriormente houve outros isolados a partir de bovinos abortados no Brasil (CORTEZ et al., 2006; BIANCHI et al., 2011), BIANCHI et al., 2011 também obteve isolados de sêmen de um bovino em uma propriedade que apresentava o

nascimento de bezerros cegos e em sangue de bovinos provenientes de uma propriedade que onde havia desordens reprodutivas.

Na Itália, DECARO e colaboradores (2011) descreveram um surto grave de doença respiratória em bezerros em uma propriedade com 6 animais clinicamente doentes diagnosticados por isolado de secreções nasais, do pulmão de dois bovinos que morreram e em um feto abortado (DECARO et al., 2012a)

Esses quadros clínicos são semelhantes aos já descritos em BVDV (Baker 1995). Porém, no surto de doença respiratória foi associado a HoBi-like vírus na Itália, também foram isoladas cepas CP e NCP do pulmão de um dos bovinos, sendo este achado compatível à Doença das Mucosas. Todavia, não foram observados sinais clínicos e lesionais comuns a este quadro, indicando que a patogenia e patogenicidade do HoBi-like vírus deve ser melhor estudadas (DECARO et al., 2012b).

2.5 Diagnóstico Laboratorial

O controle de doenças infecciosas está diretamente ligado à capacidade dos testes de diagnósticos em determinar se o animal teve contato com o agente. Para algumas doenças, o controle pode ser feito simplesmente através de teste laboratorial, sendo baseado no número de animais positivos (DUBOVI et al., 2013).

Para caracterização da importância econômica de uma doença, inclusive as causadas por *Pestivirus* a investigação diagnóstica deve envolver aspectos epidemiológicos como histórico do rebanho, sinais clínicos e achados de necropsia. A partir, destes dados, o teste diagnóstico pode ser direcionado, sendo confirmado através da associação destes dados com a detecção do agente por isolamento e/ou sorologia.

Atualmente existem diversas técnicas que avaliam a resposta sorológica do rebanho frente à infecção por *Pestivirus*. Estes testes possuem variados graus de sensibilidade e especificidade, diferentes custos e tempo de realização. As principais vantagens e desvantagens destes testes estão sumarizadas na Tabela 2.

Quadro 1. Comparação entre os diferentes testes de diagnóstico para BVDV.

Teste	Sensibilidade	Tempo	Custo
Isolamento	Alta	2-14 dias	Alta
FA	Alta	1-2 dias	Moderada
IHQ	Alta	2-4 dias	Alta
ELISA(ag)	Baixa	2-6 dias	Baixa
RT-PCR	Alta	1-2 dias	Moderada/Alta
SN	Alta	3-5 dias	Moderada
Sorol ELISA	Moderada	4-6 dias	Baixa

Fonte: DUBOVI et al., 2013.

2.5.1 RT-PCR

À medida que o estudo sobre o genoma dos *Pestivirus* evoluiu, o RT PCR tem sido utilizado para detecção do RNA viral em diferentes manifestações clínicas devido a sua alta sensibilidade (>96%) quando comparada com o isolamento viral para diagnóstico de animais PIs (DEREGT et al., 2002; TAJIMA et al., 2005; DRISKELL et al., 2006; EDMONDSON et al., 2007; Dubovi et al., 2013), permitindo que além de tecidos frescos, material embebido em parafina possa ser utilizado. As principais amostras utilizadas para detecção viral são: sangue, *pools* de sangue, soro, órgãos linfóides, fígado, pulmão, orelha, leite e sêmen (DEREGT et al., 2002; TAJIMA et al., 2005; DRISKELL et al., 2006; PILZ et al., 2007; EDMONDSON et al., 2007).

Em rebanhos leiteiros a realização de RT-PCR em amostras de tanque para BVDV possibilita a investigação em um grande número de animais e serve como uma triagem inicial (CORBIÈRE et al., 2012, DUBOVI et al., 2013).

A pesquisa em sangue ou fragmentos de orelha em animais adultos do rebanho se faz necessário já que animais PI podem sobreviver até dois anos ou

mais (HOUE 1992), incluindo os touros que podem albergar o vírus nos testículos e eliminar no sêmen sem apresentar viremia (DEREGT 2005).

As técnicas mais utilizadas para detecção de espécies virais deste gênero são descritas para amplificar uma sequência das regiões mais conservadas dos *Pestivirus*; para a codificação da região 5' utiliza-se um par de iniciadores denominados panpesti 324/326 (VILCEK et al., 1994) e para a região Npro BD1/BD2 (VILCEK et al., 2001). E também *iniciadores* para diferenciação de biótipos como os descritos por Ridpath & Bolin 1998 o que é uma grande vantagem para determinação do programa vacinal e medidas de controle da doença.

Recentemente DECARO et al., 2012c descreveu uma técnica de *nested*-PCR para detecção dos principais *Pestivirus* que infectam bovinos, incluindo o HoBi-like vírus, que na maioria dos relatos até o momento não foi detectado por estas técnicas convencionais descritas acima (SCHIRRMIEIER et al., 2004, PELETTO et al., 2010, DECARO et al., 2011). Segundo PELETTO 2010 a diferença utilizando o primer panpestivírus é de um nucleotídeo na sequência do primer 324. LIU et al., 2008 desenvolveram uma técnica específica para detecção de *Pestivirus atípicos*.

2.5.2 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica altamente sensível e específica que detecta o antígeno no tecido por meio de anticorpos específicos. Para realização da técnica utilizam-se tecidos fixados em formalina e/ou incluídos em parafina (HAINES et al., 1992; RAMOS-VARA 2011; DUBOVI et al., 2013).

A IHQ pode ser considerada um teste padrão para o diagnóstico de animais PI por BVDV utilizando-se de pele da orelha, entretanto não é considerada uma técnica adequada na detecção de BVDV na forma aguda da infecção (THUR et al., 1996, NJAA et al., 2000, CORNISH et al., 2005).

Atualmente, a biópsia de pele da orelha vem sendo largamente utilizada para detecção de animais PIs, devido a facilidade de coleta e transporte podendo ser estocadas em formol por até 30 dias e no refrigerador por mais de 10 dias antes do processamento, sem que isso ocasione resultados falsos negativos (MILLER et al., 2005). CORNISH et al., 2005 diagnosticaram 100% de PIs analisados através da IHQ.

Atualmente existem variados tipos de anticorpos anti-BVDV como, por exemplo, o anticorpo monoclonal 15c5, que reage com a proteína Erns (gp48), possuindo uma boa capacidade de detectar a maioria dos isolados do BVDV e tem sido usado com aplicações diagnósticas e de pesquisa (HAINES et al., 1992, RADOSTITS et al., 2007, SANTOS et al., 2011). Adicionalmente, o anticorpo monoclonal D89 que reage com a glicoproteína E2 (gp55) também tem sido utilizado (ZHENGET et al., 1998, CRAIG et al., 2008). A única desvantagem associada à técnica são as várias etapas em sua metodologia que pode propiciar erros (CORNISH et al., 2005).

2.5.3 Isolamento Viral

O isolamento viral é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de BVDV. Porém a metodologia empregada por cada laboratório é variável, principalmente em relação à sensibilidade da cultura de células utilizadas (DUBOVI et al., 2013).

Para o isolamento viral, o conhecimento sobre a patogenia da doença é fundamental para coletar e remeter amostras adequadas para o laboratório. BVDV pode replicar em diferentes cultivos celulares, entretanto os mais sensíveis são as células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney Cells), BT (Bovine Turbinate) e Btest (Bovine Testicle) (SANDIKI, 1999; SALIK et al., 2004). Resultado semelhante a BVDV-1 e BVDV-2 foi observado para HoBi-like vírus (DECARO et al., 2011; DECARO et al., 2012a; BAUERMANN et al., 2013).

No animal vivo, o melhor material para isolamento viral é o sangue total, do qual leucócitos são extraídos e utilizados como inóculo (SALIK & DUBOVI 2004). Outras amostras como soro, fezes, sêmen e suabes naso-faríngeos e orais, também podem ser utilizadas (RADOSTITIS et al., 2007). Em animais PIs, o vírus pode ser isolado de praticamente todos os órgãos (DUBOVI et al., 2013). Das amostras provenientes de necropsias de animais com infecção aguda e/ou fetos, os órgãos de eleição são tecidos linfóides como baço, placas de peyer, linfonodos mesentéricos e timo (SALIK et al., 2004). O importante é isolar de células mononucleares viáveis, portanto o congelamento e descongelamento sucessivo podem comprometer o isolamento viral (DUBOVI et al., 2013).

2.5.4 Sorologia

Os testes sorológicos podem ser utilizados para determinar se o animal já foi infectado com o vírus; se tem anticorpos colostrais; se é imunizado adequadamente; se está com a infecção aguda ou se foi infectado no ambiente uterino (LAUREYENS et al., 2009, DUBOVI et al., 2013),. A sorologia para BVDV pode ser realizada através de técnicas como ELISA e a soroneutralização (SN) (SALIKI & DUBOVI 2004; RIDPATH & FLORES2007).

Porém a interpretação dos resultados nem sempre é fácil devido às diferentes formas de apresentação da infecção associada ou não a aplicação de vacinas que conferem uma resposta humoral (GOYAL 2005). Os animais receberam via colostro anticorpos maternos, apresentam anticorpos até 3-8 meses após o nascimento, se houver uma titulação significativa após esse período isso indica infecção viral (GOENS 2002).

A escolha do teste utilizado depende do objetivo, se for apenas para indicar se existe ou não anticorpos, o teste de Elisa é recomendando por ser mais barato e ter boa eficiência. Mas se o objetivo é determinar ação do anticorpo frente a uma espécie viral, a soroneutralização é a mais recomendada (DUBOVI et al., 2013). Um estudo foi realizado com o objetivo de comparar a eficiência de quatro kits comerciais de ELISA, em diferenciar animais expostos à infecção natural pelo BVDV de animais vacinados com vacina inativada, nenhum dos testes se mostrou eficaz (RAUER et al., 2010). Para avaliar a soroproteção, a soroneutralização se mostra mais eficaz (DUBOVI et al., 2013).

Na infecção aguda de animais imunocompetentes, anticorpos contra BVDV podem ser detectados de 10 a 14 dias após a infecção (SANDVIK, 1999; RIDPATH; FLORES, 2007).

PIs são geralmente soronegativos, exceto quando apresentam anticorpos colostrais nas primeiras semanas após o nascimento ou quando respondem imunologicamente à exposição a vírus heterólogo ao vírus infectante (GOENS, 2002). A titulação de anticorpos em tanques de leite pode indicar a prevalência de animais soropositivos no rebanho (DIEGUEZ et al., 2009). Os exames sorológicos auxiliam na determinação da eficiência de vacinas, monitoria do status imune do rebanho e indica possível infecção (SALIKI; DUBOVI, 2004).

Para o HoBi-like vírus emprega-se as técnicas de rotina utilizadas para o BVDV. Um novo teste denominado de Imunoensaio em microesfera desenvolvido para detectar a proteína Erns de um isolado de HoBi-like, demonstrou ter mais eficiência quando comparado com os testes de ELISA (XIA et al., 2010; LARSKA et al., 2012; VIJAYARAGHAVAN et al., 2012; LARSKAN et al., 2013). Estes testes diagnósticos que utilizam a detecção de Erns e NS3 são testes quantitativos e permitem diferenciar animais doentes de animais vacinados (ÁLVAREZ et al., 2012; RAUE et al., 2011).

Um estudo desenvolvido por BAUERMANN et al., 2012 demonstraram que o HoBi-like vírus foi detectado por 5 anticorpos desenvolvidos a partir da proteína E2 imunodominante e mais variável proteína de envelope do BVDV. Porém obteve uma reatividade cruzada maior com BVDV tipo 2 inclusive na soroneutralização indicando que resultados mais confiáveis são encontrados quando utilizado uma cepa homóloga ao surto. Esses resultados indicam que mais estudos precisam ser desenvolvidos para padronizar testes diagnósticos específicos para HoBi-like vírus diferenciando assim de infecções por BVDV.

2.6 Controle e tratamento

Para a implementação de medidas de controle e prevenção de BVDV e HoBi-like vírus faz-se necessário a detecção e eliminação de animais PI; vacinação para melhorar a imunidade e prevenir reinfecção e medidas de biossegurança (LAUREYENS et al., 2009, DUBOVI et al., 2013).

É impossível implantar um programa de controle sem uma metodologia sólida de detecção de animais PI. Atualmente são utilizadas três técnicas diagnósticas na rotina de detecção de PI sendo elas: IHQ ou imunofluorescência de pele de orelha, ELISA para captura de antígeno através de amostras de pele ou leite e RT-PCR a partir de amostras de sangue, leite ou pele. Todos estes testes podem detectar PIs, entretanto o RT-PCR é considerado o teste padrão para detectar animais com a infecção aguda (DUBOVI et al., 2013; CORBIÈRE et al., 2012).

No caso do HoBi-like vírus e BVDV, o controle de lotes de soro fetal bovino é realizado por RT-PCR ou isolamento viral. Sendo fundamental para controlar a disseminação do vírus através de vacina e demais produtos biológicos (XIA 2011; STAHL et al., 2010, KOZASA et al., 2010).

Recentemente NEWCOMER et al., 2012 desenvolveram um composto aromático catiônico denominado DB772 demonstrando propriedades antivirais *in vitro* contra BVDV-1, e para as demais amostras de *Pestivirus* como BVDV-2, vírus da doença da fronteira (BDV), Hobi-like vírus, pronghorn vírus e Bungowannah vírus. Para todos esses vírus, o composto demonstrou capacidade em inibir a replicação viral em doses maiores que 0,20 μ M (micromolar). Este composto antiviral demonstrou ser eficaz para uso preventivo ou terapêutico para diversas pestiviroses.

O uso de vacinação para controlar as infecções por BVDV apresenta grandes desafios, devido à natureza do vírus, interação do vírus com o sistema imune e a sua capacidade de estabelecer infecções persistentes. As vacinas utilizadas atualmente (vivas modificadas; mortas) são eficazes em situações que a doença está controlada em nível de rebanho, sendo pouco eficazes em casos isolados, (RIDPATH 2013).

Existem dois programas de controle para BVDV que são referência para os Estados Unidos e Europa. No EUA o programa se baseia em medidas direcionadas para cada Estado com base na incidência da doença, densidade das populações de animais, movimentação dos animais, contato com populações de animais selvagens, nível de conformidade produtor e a variação entre as cepas circulantes do BVDV. Todos os programas se baseiam em fornecer informações aos produtores e fazer o diagnóstico correto da doença por médicos veterinários treinados (RIDPATH 2012).

Na Europa os programas de erradicação estão em andamento em diversos países e tem como base analisar cada região, tomando medidas zoo-sanitárias rigorosas para não permitir a introdução de BVDV em rebanhos livres e principalmente a identificação e eliminação de animais PIs, tudo isso com o uso limitado de vacinas (STAHL et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos Gerais

Realizou-se a investigação em uma propriedade de criação extensiva de bovinos de corte, no município de Cuiabá /MT, onde ocorreu um surto de mortalidade de bezerros nos meses de dezembro de 2010 a junho de 2011.

Informações sobre o histórico do rebanho, quadro clínico e prejuízo econômico direto, foram obtidas com a proprietária e vaqueiros.

Durante a ocorrência do surto, o responsável pela propriedade encaminhou um bezerro (1) morto para Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá (LPV-UFMT). E dois meses após encaminhou outros dois bovinos doentes (2 e 3) foram encaminhados ao Hospital Veterinário (HOVET/UFMT) para acompanhamento clínico.

Estes animais ficaram alojados em baias do HOVET onde receberam fluidoterapia e leite. Durante o período de observação houve a aferição dos parâmetros clínicos. Entretanto os dois morreram espontaneamente e foram necropsiados. Posteriormente, em uma visita a propriedade, amostras de biópsias orelha e sangue com e sem EDTA foram coletadas, de fêmeas bovinas e bezerros que apresentavam que pertenciam ao lote de animais que tiveram transtornos reprodutivos e ou nasciam fracos.

3.2 Necropsias e avaliação histológica

Durante as necropsias dos bezerros as alterações macroscópicas observadas foram anotadas. Para exame histopatológico coletou-se fragmentos de pele, língua, esôfago, pulmão, coração, baço, linfonodos, intestino, fígado, rins, rúmen, retículo, omaso, abomaso e o encéfalo, que foram fixados em formalina tamponada 10% por 48 horas, incluídos em parafina, para a obtenção de cortes histológicos e posterior confecção de lâminas histológicas para a coloração por hematoxilina-eosina (HE) e lâminas de Poly-L-lysine para imuno-histoquímica (PROPHET et al., 1992).

3.3 Coleta de amostras de orelha e sangue

A biópsia de orelha foi realizada na propriedade pela equipe do LPV-UFMT. fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,5 cm de largura foram coletadas da ponta do pavilhão auricular de 42 animais (11 bezerros e 31 vacas). Essas amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo solução de formalina a 10% por 24 horas. Este material foi desidratado em soluções crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (PROPHET et al., 1992). Posteriormente, foram realizados cortes de 5 micrometros em lâminas de

Poly-L-lysina, submetidas ao teste imuno-histoquímico. Adicionalmente foram coletadas amostras de sangue com e sem EDTA.

3.4 Imuno-histoquímica

A técnica foi realizada em amostras de pele, língua, esôfago, pulmão, coração, tireoide, timo, pâncreas, baço, linfonodos, intestino delgado e grosso, fígado, rins, rúmen, retículo, omaso, abomaso e encéfalo. A técnica foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal D89 (VRMD), que foi diluído em solução salina na concentração de 1:400.

As lâminas foram desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções decrescentes de álcool etílico e lavadas em água destilada. A recuperação antigênica utilizada foi calor, as lâminas foram armazenadas em cubas com solução de tampão citrato pH 6.0 e levadas ao microondas por 3 minutos e as marcações inespecíficas foram reduzidas a partir aplicação de leite desnatado a 5% por 20 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi aplicado por 14 a 16 horas (overnight) a 4° C, em câmara úmida. Posteriormente, utilizou-se anticorpo secundário biotinilado e solução streptavidina conjugada a uma molécula de peroxidase (LSAB + System HRP, DakoCytomation) por aproximadamente 20 minutos cada, a temperatura ambiente. As lâminas eram então lavadas em água destilada e após houve preparação da solução reveladora. Esta consistia do cromógeno Vector® Nova RedTM que era diluído conforme instruções do fabricante em 5ml de água destilada, era aplicado sobre as lâminas 100 microlitros da solução por 15 minutos. Fez-se contracoloração com hematoxilina por 20 segundos, seguida de lavagem em água e secagem em ar corrente, para posterior passagem em xilol e montagem com Entellan. Em alguns casos incluíram-se controles negativos substituindo apenas o anticorpo primário por solução de PBS.

3.5 Isolamento Viral

Amostras de pulmão, fígado, baço, linfonodos, rim, sangue e soro foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual de Londrina para a realização do isolamento viral e a transcrição reversa seguida de reação da cadeia da polimerase (RT-PCR) e posteriormente realizou-se o sequenciamento e análise filogenética.

O material foi inoculado em linhagem celular MDBK (ATCC, CCL-220) mantida em meio mínimo de Earle modificado por Dulbecco, suplementado com 5% de soro fetal bovino livre de BVDV e acrescido de 200 UI/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina e incubadas a 37°C. O monitoramento da replicação viral foi realizado através da observação de efeito citopático para as amostras citopáticas ou através do teste de imunofluorescência indireta para BVDV para as amostras não citopáticas após três passagens em células MDBK, ou pela RT-PCR.

3.6 RT-PCR

O RNA foi extraído utilizando Trizol®LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. O ensaio de RT-PCR foi realizada utilizando o conjunto de iniciadores para a forward 324 (5 'ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3'), e 326 reverse (5 'TCA ACT CCA TGT GCC AGT TAC 3') concebido para amplificar a 288 pb da região 5'UTR do genoma de BVDV. Também foi utilizado o par de iniciadores forward BD1 (5'-TCT CTG CTG TAC ATG GCA CAT G-3 '), e BD3 reverse (5'-CCA TCT ATR CAC ACA TAA ATG TGG T-3') concebido para amplificar um 428 bp amplicon comprimento de parte da região do genoma de Npro BVDV (VILCEK et al., 1994, 2001).

O fragmento amplificado da UTR 5 'da amostra de sangue foi clonado utilizando o kit de clonagem TOPO TA de Sequencing (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a diferenciação dos biótipos foi utilizado os primers; NS2-3-Foward → 5'-GCA GAT TTT GAA GAA AGA CAC TA- 3' e NS2-3-Reverse → 5'-TTG GTG TGT GTA AGC CCA- 3' para amplificar 402 pb em amostras NCP e/ou 650 pb em amostras CP como descrito por (KARAOĞLU et al., 2003).

A RT-PCR foi realizada como se de acordo com LUNARDI et al, 2008, e os produtos foram submetidos a electroforese em gel de 2% de agarose corado com brometo de etídio (0,5 mg / ml) em TBE tampão pH 8,4 (89 mM Tris-HCl, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA), em tensão constante (90 V) durante aproximadamente 45 min, e visualizados sob luz UV.

3.7 Sequenciamento e análise filogenética

A sequência das amostras amplificadas foram purificadas utilizando GFX™ PCR DNA e Gel Purification Kit Band (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), quantificado em Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, EUA) e sequenciados em ABI3500 1000/Automated 96 Capilar Sequência de DNA, Thermo Sequenase™ DNA polimerase II e o DYEnamic ET Dye Terminator™ Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Análises filogenéticas foram realizadas com o software MEGA, versão 5.05 (TAMURA et al., 2007). As análises foram baseadas em um neighbor-joining método a partir do modelo de Kimura dois parâmetros e a inicialização foi estatisticamente suportado com 1000 repetições.

3.8 Soroneutralização

Utilizou-se a cepa citopática NADL do BVDV 1a que foi multiplicada em células MDBK cultivadas em meio Eagle-Dulbecco (Invitrogen® Life Technologies, EUA) suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) livre de micoplasmas, vírus e de anticorpos contra o BVDV (Invitrogen® Life Technologies, EUA), 55mg/mL de gentamicina (Sigma Co, EUA) e 2,5mg/mL de anfotericina B (Sigma Co., EUA). A monitoria da contaminação das células e das partidas de SFB com BVDV NCP foi realizada por meio da RT-PCR (PILZ et al., 2005), utilizando os *primers* descritos por WEINSTOCK et al. 2001. O título viral da suspensão celular foi calculado pelo método REED & MUENCH 1938.

A técnica de vírus-neutralização foi utilizada para detecção de anticorpos contra BVDV nas amostras de soro dos animais do rebanho e dos animais que morreram na propriedade. A técnica utilizou microplacas de acordo com PILZ et al., 2005. Foram avaliadas diluições crescentes dos soros frente a doses constantes da cepa NADL CP do BVDV 1a 100DICC50 (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) e diluições seriadas (base 2) dos soros. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

O título de anticorpos foi expresso como a recíproca da maior diluição do soro que inibiu a replicação viral na monocamada celular induzido pela cepa viral padrão. Foram consideradas positivas as amostras que, após 72 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, inibiram o ECP do BVDV a partir da diluição 1:8

3.9 Avaliação econômica

O impacto econômico gerado pela doença foi estimado através do cálculo do custo direto da doença no rebanho através da metodologia descrita por Bennett et al., 1999, para determinar as perdas direta pela doença:

C = perdas diretas doença

L= perda esperada

$C = L+T+P$

T= custo com tratamento

P= custo com prevenção

4. RESULTADOS

4.1 Dados epidemiológicos

A mortalidade de bezerros ocorreu em uma propriedade de criação extensiva, fase cria, localizada no município de Cuiabá/MT, que possuía um rebanho de 346 vacas, 4 touros e aproximadamente 295 bezerros, criados em sistema Voisin, em uma área de 294 hectares, dividida em piquetes com 1 ha cada contendo 15 represas e 5 bebedouros. A propriedade utilizava inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com posterior repasse de touros. O sêmen utilizado era proveniente de centrais de inseminação artificial que faziam testes regularmente para BVDV e a taxa de concepção obtida era em média de 60%.

Os bovinos alimentavam-se exclusivamente de pasto (Fig. 1A e 1B), com suplementação mineral, recebiam vermifugação nos meses de maio e novembro e vacinação regular para Brucelose, Febre Aftosa, Carbúnculo, porém não eram imunizados para BVDV. Em épocas de escassez de pastagens, arrendavam-se pastos em propriedades vizinhas. Não foram introduzidos bovinos novos no plantel, até 12 meses antes do surto aqui descrito. Não foram relatadas alterações reprodutivas como aborto, natimorto, retorno ao cio frequentes ou malformações no rebanho nem antes do surto nem após o início da mortalidade. Relatou-se que um bezerro nasceu subdesenvolvido, deformado e morreu com duas semanas de idade.

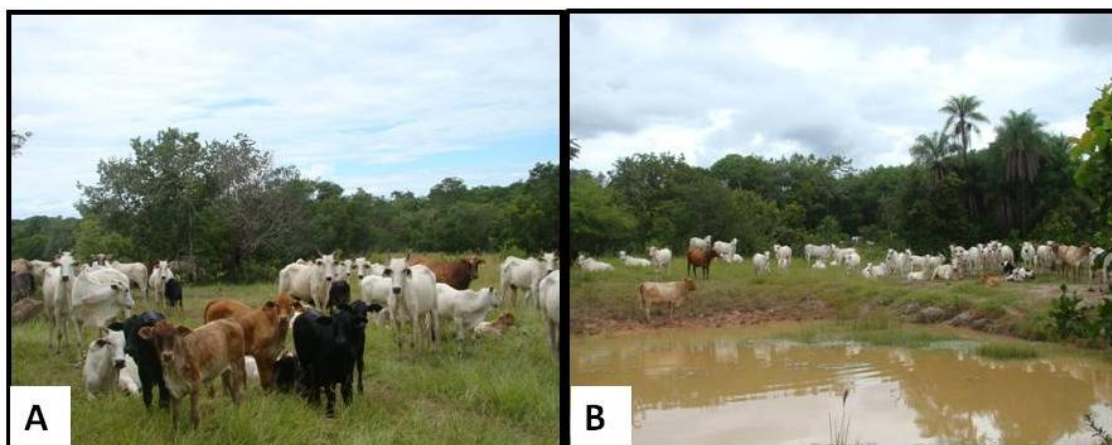


Figura 1 (A) e (B). Bovinos pertencentes à propriedade onde ocorreu o surto de HoBi-Like virus.

4.2 Análise clínico-patológica

Bezerros com idade entre 1 e 9 meses foram acometidos e apresentaram diarreia de amarelada a enegrecida (Fig.2C), febre, desidratação profunda, apatia (Fig.2A), anorexia, lesões ulcerativas na cavidade oral (Fig.2B e 2D) e lesões crostosas nos membros e narina. Todos receberam tratamento, porém não houve resposta terapêutica e morreram com evolução clínica de 5 a 20 dias.

No bezerro 1 (N65/11) foi observado pela proprietária e vaqueiros da fazenda uma apresentação clínica menos severa, que caracterizava-se por uma diarreia amarelada, líquida e desidratação profunda. Na necropsia as principais alterações macroscópicas no Bezerro 1, foi conteúdo amarelado e pastoso no intestino e peritonite fibrinopurulenta associada com infecção umbilical. Microscopicamente o Bezerro 1 apresentou onfaloflebite e peritonite supurativa. Nos Bezerros 2 (N 201/11) e 3 (N210/11) os achados foram similares, observou-se áreas de alopecia difusa no dorso, hiperqueratose epidermal (Fig. 3B), úlceras recobertas por placas de fibrina no plano nasolabial (Fig.3A), na cavidade oral se estendendo (Fig.3C) da mucosa língua ao palato duro, além de aplainamento e hiperemia de papilas orais. Erosões com tendências lineares irregulares foram observadas na língua, no esôfago e nos pilares da parede ruminal e linfonodos mediastínicos tumefeitos (Fig. 3D).

O rúmen havia atrofia de papilas e no abomaso e o conteúdo era vermelho-escuro similar à borra-de-café com coágulos de sangue e grumos de fibrina. No

intestino o conteúdo estava líquido, tinha coloração avermelhada, continha grumos de fibrina e as placas de peyer estavam evidentes, necróticas e recobertas por fibrina. Extensas áreas, multifocais de necrose, recobertas por camadas de fibrina, eram observadas em toda extensão do trato digestivo e ocasionalmente na pele. Tabela 2.

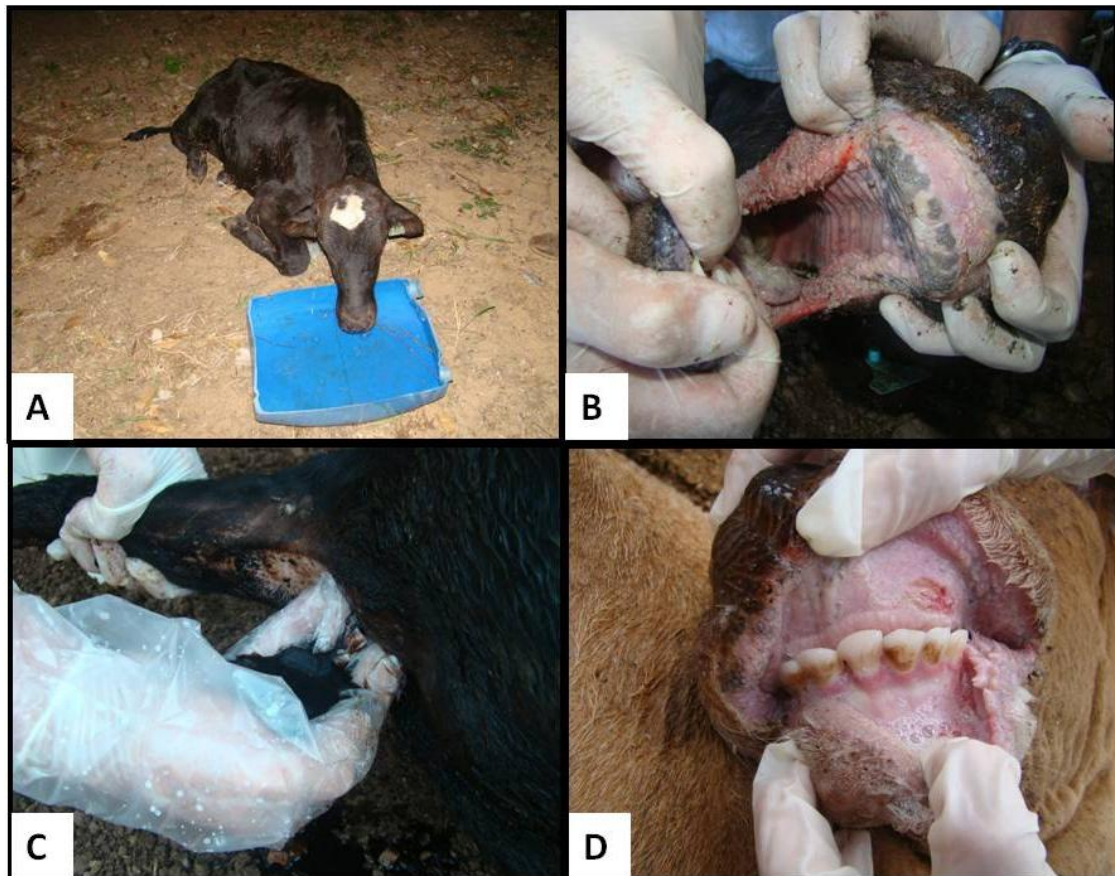


Figura 2. Infecção por Hobi-Like virus. Bezerra 2. (A) Apatia e anorexia. **(B). Mucosa oral:** Múltiplas úlceras na gengiva recobertas por placas defibrina **(C)** diarreia profusa líquida de coloração enegrecida. **Bezerra 3. (D) Mucosa oral:** com úlcera de aproximadamente 2 cm de diâmetro na gengiva

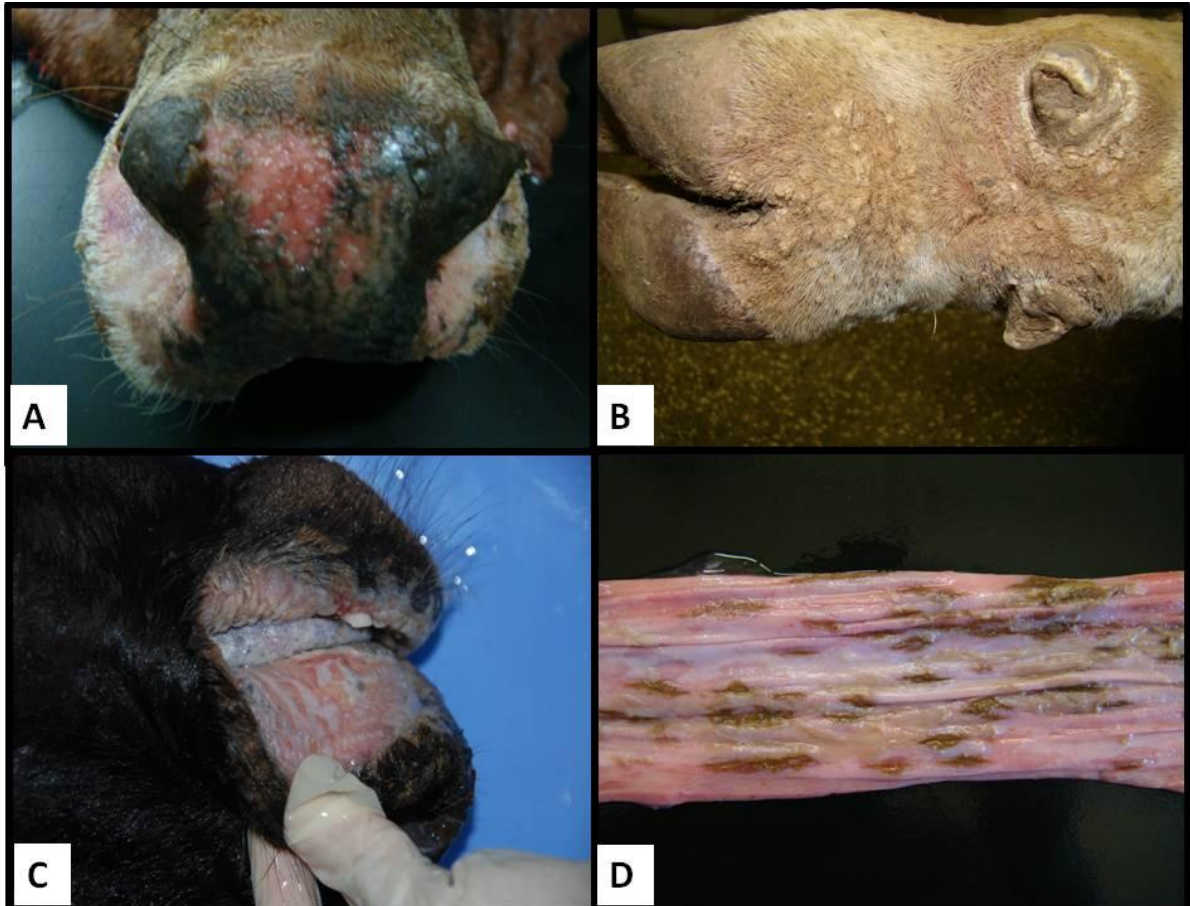


Figura 3. Infecção por HoBi-Like virus. Bezerro 3: (A) Plano nasal: áreas de ulceração. (B) Hiperqueratose na região palmar. Bezerro 2: (C) Mucosa oral: áreas de ulceração. (D) Esôfago: Úlceras lineares na mucosa de coloração escura

Tabela 2. Lesões macroscópicas bezerros infectados com HoBi-like

LOCALIZAÇÃO	B1	B2	B3
1. PELE			
- Plano nasal			
Lesões ulcerativas e crostas	-	+	+++
- Região palmar, plantar e interdigital de membros			
Lesões crostosas	-	+	+++
2. CAVIDADE ORAL			
- Palato, Gengiva e língua			
Lesões ulcerativas e erosivas	-	+++	++
3. TRATO DIGESTÓRIO SUPERIOR			
- Esôfago			
Úlceras lineares	-	+++	++
4. TRATO DIGESTÓRIO INFERIOR			
- Rúmen e abomaso			
Úlceras	-	+	+/-
- Intestino delgado			
Necrose em placa de peyer, conteúdo líquido com grumos de fibrina.	-	+++	+++
- Intestino Grosso			
Necrose em placa de peyer, conteúdo líquido com grumos de fibrina	-	+	+

NC (Não coletado); sem marcação - ; marcação discreta (+); marcação moderada ++; marcação acentuada +++.

Microscopicamente havia principalmente necrose multifocal extensa, no epitélio da cavidade oral, incluindo língua, e do esôfago, do rúmen e de abomaso associado infiltrado inflamatório polimorfonuclear difuso leve e queratinização de células epiteliais (Fig.4 A e D). Na pele havia hiperqueratose e proliferação acantomatosa difusa acentuada associada a infiltrado inflamatório mononuclear na junção dermo-epidermal (Fig. 4 C). No intestino observou-se necrose de enterócitos difusa acentuada com perda de padrão das vilosidades além acentuada dilatação de criptas com debris celulares em seu interior (Fig. 4 B).

No rúmen e abomaso havia áreas multifocais de necrose associada a infiltrado inflamatório misto moderado. Na pele havia hiperqueratose e proliferação acantomatosa difusa acentuada associada a infiltrado inflamatório mononuclear difuso moderado. Tabela 3.

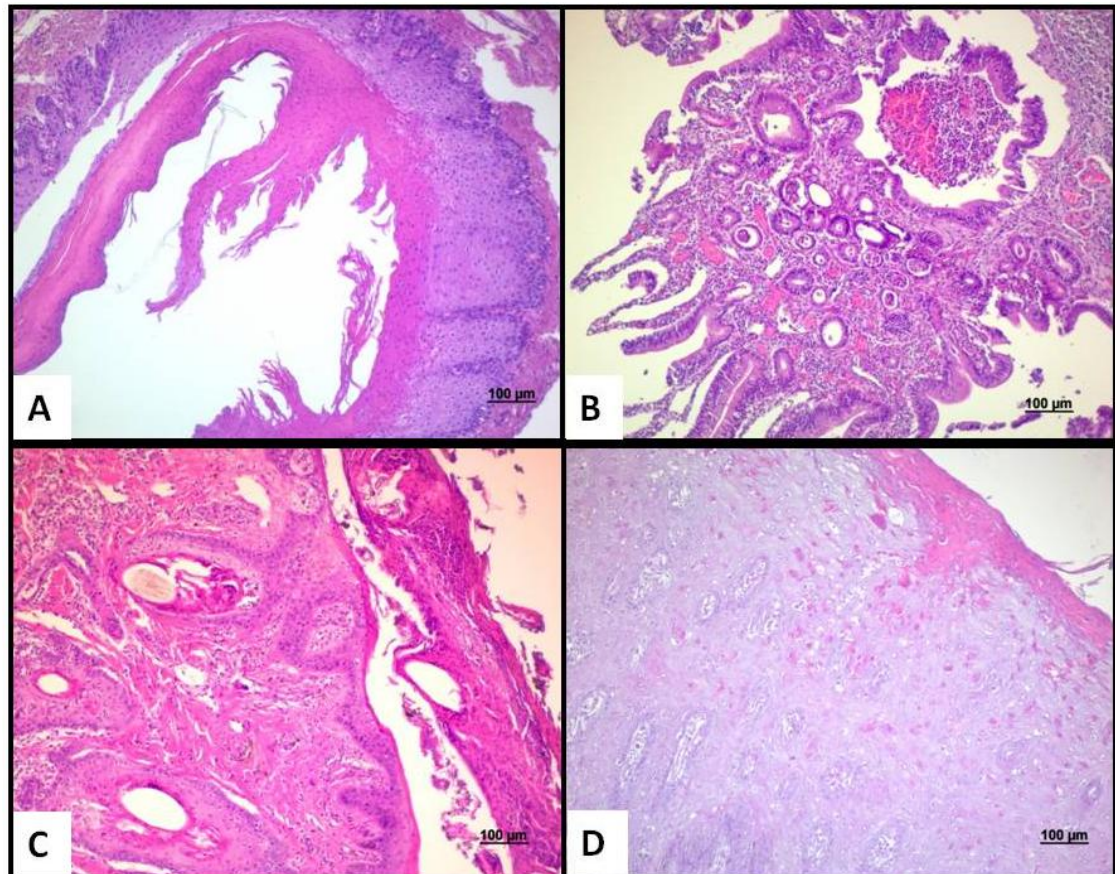


Figura 4. Bezerra 2. (A) Esôfago: Área focalmente extensa de hiperqueratose. HE obj. 10x
(B) Intestino: Enterite mononuclear difusa acentuada com dilatação de criptas e deposição de debris celulares em seu interior. HE obj. 10x. **Bezerra 3. (C) Pele:** Formação de crosta focalmente extensa associada a infiltrado inflamatório mononuclear multifocal leve na derme. HE obj. 10x. **(D): Gengiva:** Acantose difusa acentuada associada à queratinização de células epiteliais. HE obj. 10x.

Tabela 3. Lesões histológicas observadas nos bezerros (B) necropsiados

Órgãos	B1	B2	B3
1. PELE			
- Plano nasal			
Dermatite necrótica	-	+	+++
- Região palmar, plantar e interdigital de membros			
Hiperqueratose	-	+	+++
2. CAVIDADE ORAL			
- Palato, Gengiva			
Estomatite mononuclear necrosante	-	+++	++
- Língua			
Glossite mononuclear	-	+++	++
3. TRATO DIGESTÓRIO SUPERIOR			
- Esôfago			
Esofagite necrótica mononuclear	-	+++	++
4. TRATO DIGESTÓRIO INFERIOR			
- Rúmen			
Ruminite necrótica	-	+	+/-
- Abomaso			
Abomasite necrótica	-	+	+/-
- Intestino delgado			
Enterite necrosante e dilatação de criptas.	-	+++	++
Serosite fibrino-supurativa	+++	-	-
- Intestino Grosso			
Enterite necrótica	-	+	+

NC (Não coletado); sem marcação - ; marcação discreta (+); marcação moderada ++; marcação acentuada +++.

4.3 Imuno-histoquímica

No Bezerro 1 (N65/11) observou-se marcação positiva em células epiteliais das criptas intestinais e células epiteliais de túbulos renais (Fig 5A). Nos Bezerros 2 e 3 principalmente em células epiteliais da pele (Fig 5D), narinas (Fig 5C), gengiva (Fig 5B), língua e esôfago. Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição e quantificação da marcação imuno-histoquímica em órgãos coletados de 3 bezerros que morreram no surto de mortalidade em uma propriedade no Município de Cuiabá, MT, no período de abril a maio de 2011.

Órgãos	B1	B2	B3
Cortex	-	-	-
Cerebelo	-	-	-
Medula oblonga	-	-	-
Língua	NC	+++	+++
Gengiva	NC	+++	+++
Pele (focinho)	NC	+++	+++
Pele (MP)	NC	+++	+++
Coração	-	-	-
Pele Orelha	NC	++	(+)
Pulmão	-	-	-
Tireóide	-	-	-
Linfonodo mediast	-	-	-
Esôfago	NC	+++	+++
Timo	-	-	-
Baço	-	-	-
Pâncreas	-	-	-
Fígado	-	-	-
Rúmen	-	-	-
Retículo	-	-	-
Omaso	-	-	-
Rim	+	-	-
Abomaso	-	-	-
Intestino Delg	++	-	-
Intestino Grosso	-	(+)	-

NC (Não coletado); sem marcação - ; marcação discreta (+); marcação moderada ++; marcação acentuada +++.

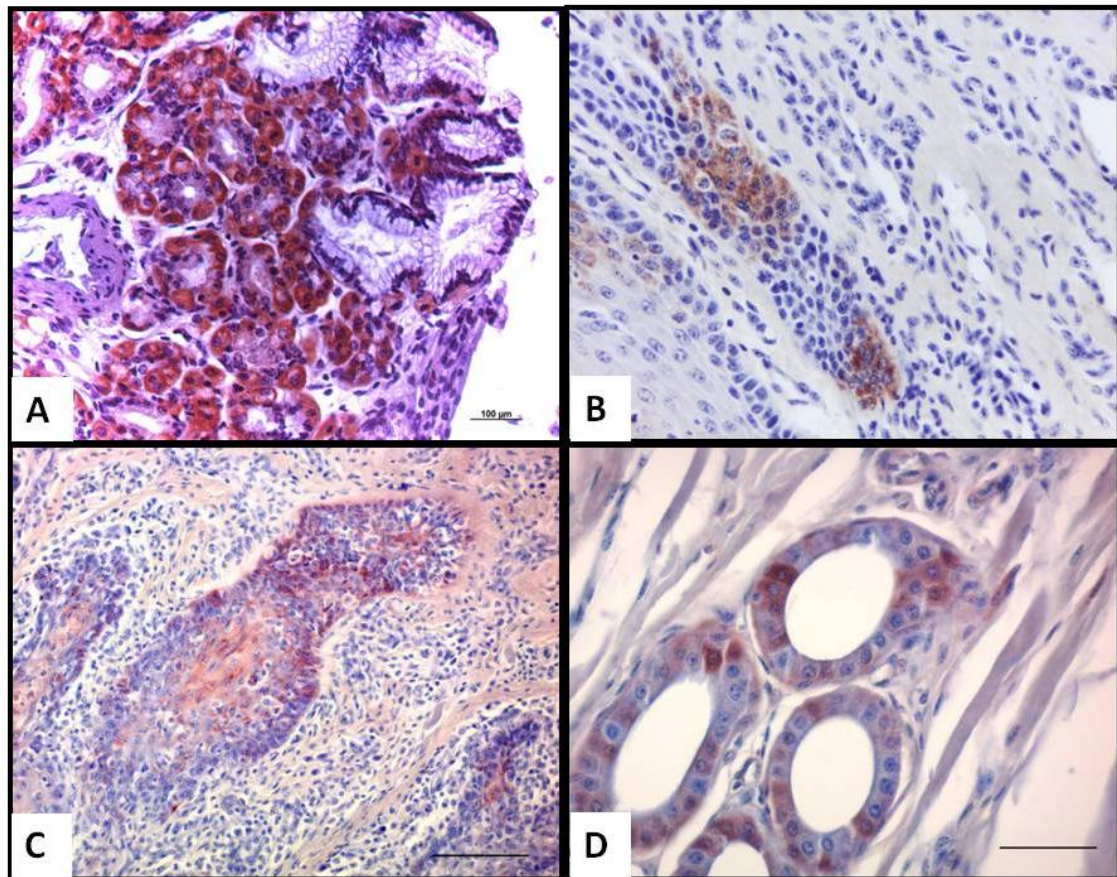


Figura 5. Técnica de imuno-histiquímica com anticorpo D89 (VRMD)) em amostras de bezerros da propriedade onde ocorreu mortalidade associada ao HoBi-like vírus no Município de Cuiabá, MT. Bezerro 1. (A) Intestino delgado: citoplasma de enterócitos marcadas em vermelho. IHQ, obj. 40x. Bezerro 2. (B) Gengiva: Marcação em vermelho no citoplasma de células epiteliais, IHQ, obj. 40x. Bezerro 3. (C) Pele (narina): Marcação do citoplasma de células epiteliais. IHQ, obj. 40x. (D) Pele: Marcação do citoplasma de células epiteliais. IHQ, obj. 20x.

4.4 RT-PCR e análise filogenética

A análise molecular do material coletado dos bezerros 2 (N201/11) e 3 (210/11), através do RT-PCR revelou amplificação de um produto com 288 pb da região 5' UTR e de 428 pb da região N^{pro} de todos os tecidos analisados. A amostra de sangue do animal 3 (N201/11) que foi clonada também amplificou 288 da região 5' UTR.

As melhores sequências obtidas do animal 3 (N201/11) foram a partir de fragmentos de baço (N^{pro}), pulmão (N^{pro}) e sangue (5'UTR) e do animal 4 (210/11) foram de baço (5'UTR e da N^{pro}), linfonodo e rim (5'UTR). A seguir, foi realizado então o sequenciamento dos amplicons do baço (LPV-WR/BR11) das duas regiões do genoma viral (5UTR e Npro). O alinhamento múltiplo das sequências obtidas, agora denominadas LPV-WR/BR11, agruparam no cluster HoBi vírus. A análise dos produtos de amplificação da região N^{pro} apresentaram identidade de sequência dos nucleotídeos de 94,3% com a estirpe IZSPLV_do isolado de um lote de FCS. Já a análise da região 5'UTR demonstrou similaridade maior que 98,8% com as estirpes SVA/cont-08 e Hobi/Brazil/315/2004. Fig. 8 N^{pro} e Fig 9. 5' UTR.

As amostras de soro dos 42 animais do rebanho não amplificaram na RT-PCR para BVDV. Na RT-PCR realizada com o sangue da amostra 3 (N201/11) obteve-se uma amplificação de 450pb o que sugere que a amostra é citopática.

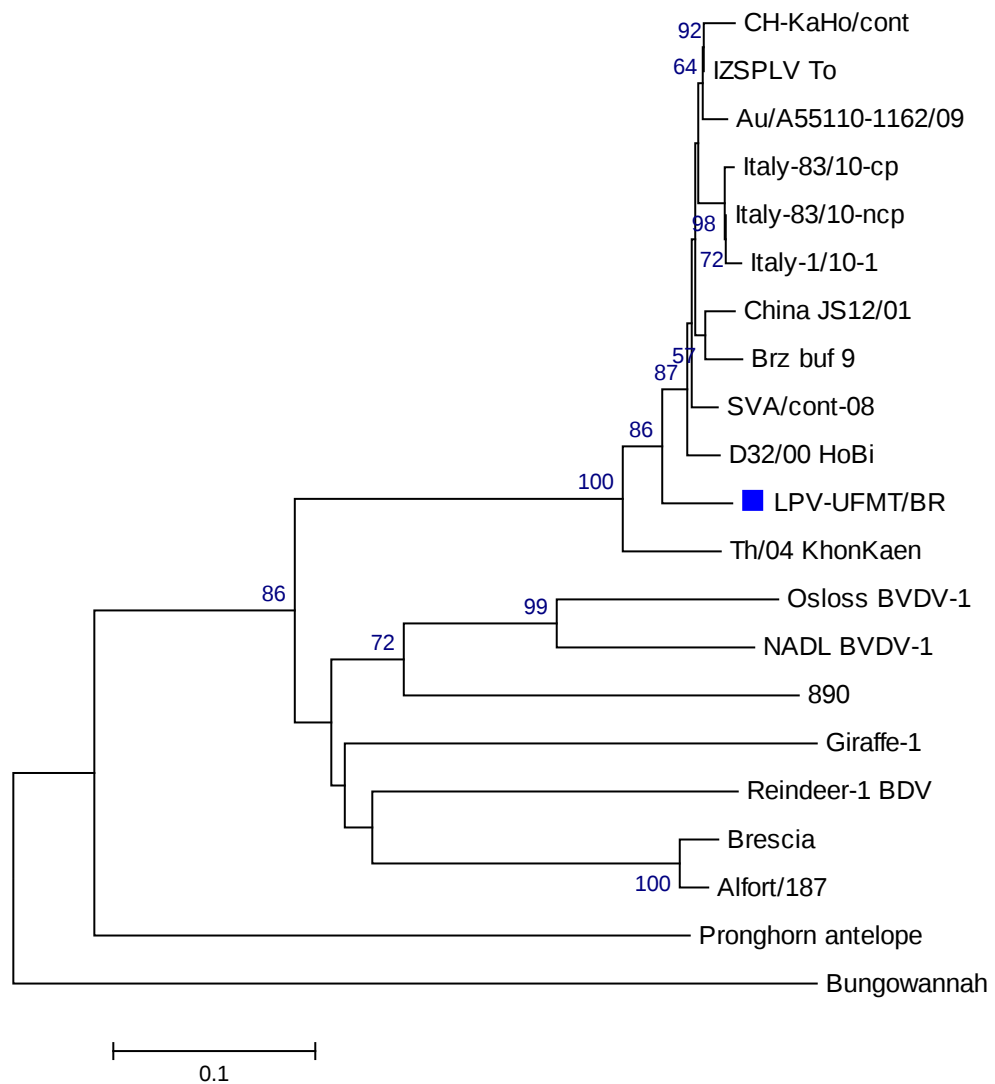


Figura. 6. A análise filogenética da cepa LPV-UFMT/BR um fragmento de 428 pb das seqüências Npro de representantes selecionados de cada uma das espécies conhecidas do gênero *Pestivirus*. A árvore foi construído utilizando neighbor-joining e Kimura dois parâmetros como um modelo de substituição de nucleótidos. Sequências utilizadas no alinhamento foram adquiridos a partir de GenBank.

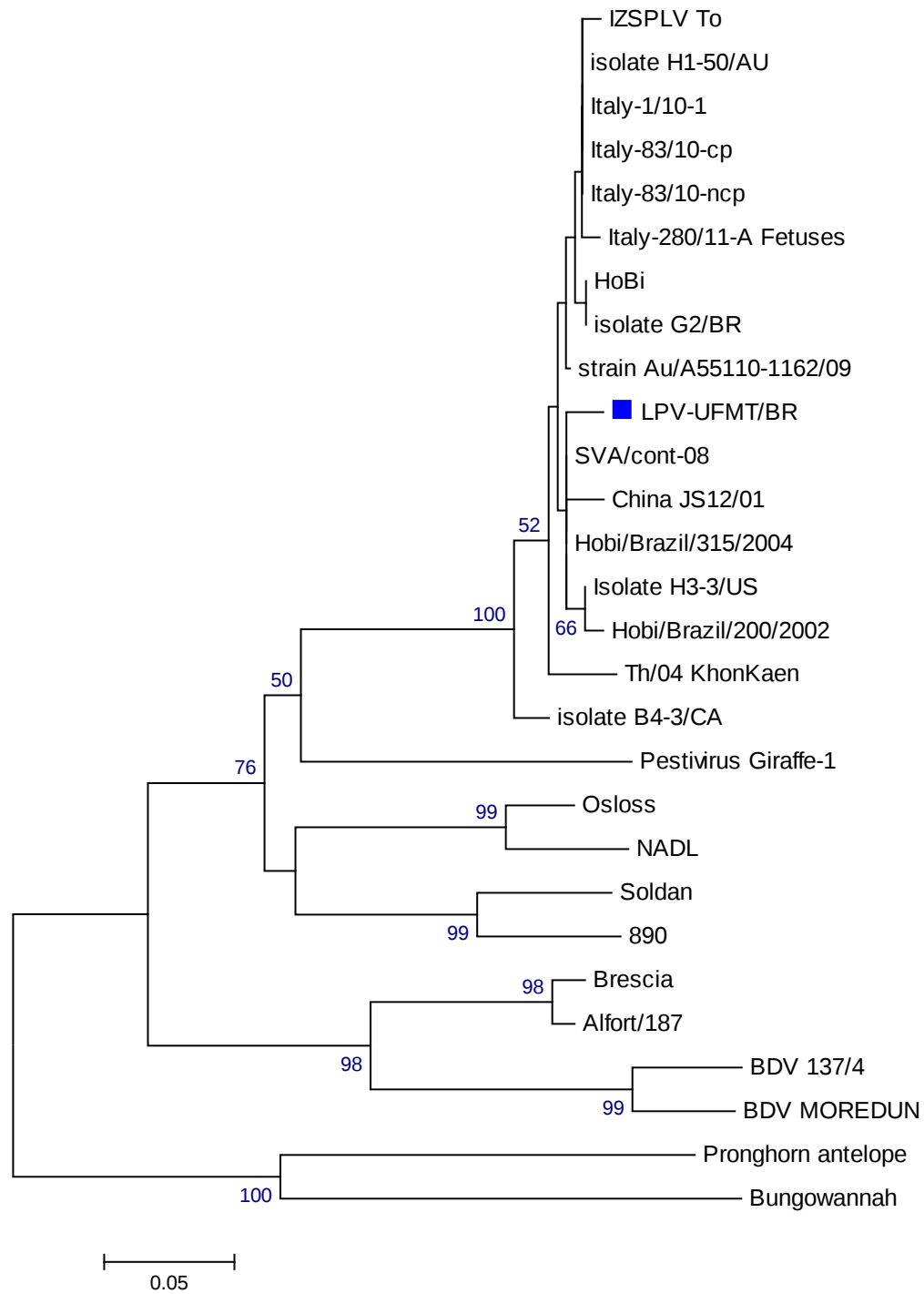


Fig.7. A análise filogenética da cepa LPV-UFMT/BR um fragmento de 288 pb das seqüências 5'UTR de representantes selecionados de cada uma das espécies conhecidas do gênero *Pestivirus*. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining e Kimura dois parâmetros como um modelo de substituição de nucleótidos. Sequências utilizadas no alinhamento foram adquiridos a partir de GenBank.

4.5 Soroneutralização

Na soroneutralização usando BVDV-1a cepa NADL identificou a maioria dos animais com títulos baixos de anticorpos (<4), 23 (7,1%) animais, sendo 10 bezerros e 13 vacas. Duas vacas foram não-reagentes, sendo que uma delas era mãe do bezerro 2, porém foram negativas na RT-PCR. As maiores titulações foram observadas em 7 (2,2%) que apresentaram título acima de 32. Os demais animais apresentaram titulação que variou de 4 a 16. Os resultados estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5: Titulação BVDV apresentada por vacas e bezerros após surto de mortalidade de bezerros por HoBi-like vírus em propriedade no Município de Cuiabá, MT em 2011.

Categoria animal	Anticorpos		Total
	Sim	Não	
Bezerro	6	5	11
Vaca	25	6	31
Total	31	11	42

Sim: Titulação >4

Não: Titulação < 2

4.6 Análise econômica

O custo direto da doença representou, um total de R\$22.5547,60 sendo que R\$16.000,00 correspondeu à perda esperada, R\$772,00 gastos com medicamento e R\$5.775,60 gastos com prevenção, detalhes na Tabela 6.

Tabela 6. Custos diretos do Surto de HoBi-like vírus no rebanho bovino atendido pela equipe do LPV-UFMT.

Medicamento	Preço (reais)	Gasto/Perdas	Total de gastos
Antibiótico 1	40,00	3 frascos	120,00
Antibiótico 2	29,00	4 frascos	116,00
Antitóxico	12,00	3 frascos	36,00
Polivitamínico	100,00	4 fracos	400,00
Soro	10,00	10 litros	100,00
Vacina para Rotavírus e E. coli (Bezerros)	120,00 (40 doses)	275 doses	825,00
Vacina Rotavírus vacas (Dose e reforço)	120,00 (40 doses)	728 doses	2.184
Vacina BVDV e IBR (Dose e reforço)	95,00 (25 doses)	728 doses	2.766,60
Perdas diretas de bezerros	800	20 bezerros	16.000
		TOTAL	22.547,60

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo o diagnóstico da infecção por HoBi-like vírus baseou-se no resultado da técnica de RT-PCR, sequenciamento e análise filogenética, das amostras dois bezerros necropsiados associado ao quadro epidemiológico, clínico e patológico obtidos na propriedade onde ocorreu mortalidade de bezerros.

Amostras de fígado, baço, rim, timo, linfonodos, pulmão, sangue e soro foram analisadas por RT-PCR e houve amplificação das regiões 5'UTR e N^{pro} do genoma viral. O produto da clonagem também amplificou para a região 5'UTR do BVDV. Os produtos de amplificação foram sequenciados, analisados e agrupados como Hobi-Like vírus.

Com grau de similaridade acima de 94% com a amostra IZSPLV_ (PELETTTO et al., 2010) na região 5' UTR e acima de 98% com as amostras com SVA/cont-08 (LIU et al., 2008) e Hobi/Brazil/315/2004 (CORTEZ et al., 2006) na N^{pro}. Todas estas amostras tem origem brasileira o que demonstra que este vírus está amplamente disseminado no Brasil e que assim como as estirpes Hobi/Brazil/315/2004 (CORTEZ et al., 2006) e a Italy-83/10 (DECARO et al., 2011) estão relacionadas com apresentação clínica, sendo que as três pertencem ao grupo de amostras brasileiras como descrito por STAHL et al., 2010.

Neste estudo, utilizou-se na RT-PCR iniciadores panpestivírus 324/326 para região 5' UTR (VILCEK et al., 1994) e o BD1 e BD3 para a região Npro (VILCEK et al., 2001). Segundo diversos estudos iniciadores panpestivirus não foram capazes de amplificar o HoBi-like virus (SCHIRRMIEIERET et al., 2004; PELETTTO et al, 2010; DECARO et al, 2011). Segundo PELLETTO et al., 2010, em estudo realizado com a cepa IZSPLV, para o primer 326/324 existe a diferença em um nucleotídeo do primer 324 que não permite a amplificação, o que não foi observado no nosso estudo. Mas assim como nos estudos desenvolvidos por Cortez et al., 2006 e Bianchi et al., 2011 houve a amplificação de HoBi-like com primers para detecção de BVDV e *Pestivirus*.

O quadro clínico e as lesões macroscópicas e histopatológicas encontradas no surto, foram semelhantes aos já descritos em infecções agudas por cepas hipervirulentas de BVDV-1, BVDV-2 e em casos de doenças das mucosas (BAKER et al., 1995; HAMERS et al., 2001; ODEÓN et al., 2003; RIDPATH et al., 2006;

FLORES et al., 2007; LUNARDI et al., 2008; SANTOS et al., 2011; HESSMAN et al., 2012).

A dermatite digital acompanhada de formação de crostas nas narinas, com secreção nasal e ocular foi descrita na forma crônica da doença das mucosas (POTIGIETER 2004). No presente estudo, esta forma da doença das mucosas (DM) não pode ser descartada uma vez que houve a amplificação de um produto de 650pb da região da proteína NS2-3 sugerindo tratar-se de uma cepa CP (KARAOĞLU et al., 2003). Todavia, devido à ausência de isolamento viral das amostras encaminhadas não foi possível confirmar a presença da cepa NCP, impossibilitando afirmar que o quadro clínico apresentado tratava-se de doença das mucosas (ODEÓN et al., 2003 e LAUREYNS et al., 2011).

A imuno-histoquímica demonstrou acentuada marcação células epiteliais e linfóides em órgãos do sistema digestório e pele. Segundo BRODERSEN 2004 a marcação de células dendríticas, queratinócitos e células epiteliais de glândulas sudoríparas e sebáceas é uma característica comum a animais PI, porém em nosso estudo ainda não foi possível caracterizar tal quadro, pois não houve até o momento o isolamento do vírus.

Na RT-PCR e IHQ dos animais do rebanho não foi possível confirmar a presença de animal PI, uma vez que os únicos animais BVDV positivos foram a óbito. Nem mesmo as mães de bezerros que morreram no surto, similar ao descrito por HOUE 1999, que a porcentagem de animais PI dentro do rebanho é muito baixa. A sorologia indicou que a maioria dos bezerros apresentou uma titulação baixa < 4 , porém foram negativos na RT-PCR o que descarta a possibilidade de infecção persistente.

Dos bovinos analisados na soroneutralização, 7 vacas adultas apresentaram titulação acima de 32 o que indica forte reação sorológica, possivelmente devido a recente exposição viral.. Os resultados obtidos pela técnica de soroneutralização indicam a presença de anticorpos neutralizantes para a cepa BVDV tipo 1a. Entretanto, o HoBi-like apresenta baixa reatividade cruzada com o BVDV tipo 1 quando comparado com o BVDV tipo 2 sugerindo que na presença de um surto o ideal seria a utilização de uma cepa homóloga ao vírus conforme o estudos desenvolvidos por LARSKA et al., 2013 e BAUERMANN et al., 2012.

Acredita-se que as principais fontes de disseminação do HoBi sejam soro fetal bovino (FBS) contaminado utilizado na produção de vacinas, outros produtos

biológicos e técnicas utilizadas para reprodução animal como a transferência de embriões (TE) (BAUERMANN et al., 2013). No presente estudo, anteriormente ao surto, o rebanho não era imunizado para BVDV e não utilizava a TE no seu manejo reprodutivo. Entretanto havia contato com animais de propriedades vizinhas e realizava reposição externa de novilhas, sugerindo que as fêmeas poderiam ter contato com animais PI através deste manejo. A utilização de IATF e IA também podem representar um risco adicional aos animais, uma vez que aumentam a exposição a visitantes e podem comprometer a segurança.

Foi estimado que o custo da doença, entre mortes de bezerros, medidas terapêuticas, foi de aproximadamente R\$22500,00. Considerando-se que o lucro líquido médio da venda de um bezerro para engorda está entre R\$200,00, seria necessário vender 100 bezerros para cobrir os custos gerados pela doença, levando em conta que nessa propriedade há em média o nascimento de 300 bezerros por ano, o prejuízo gerado no surto representou um terço do lucro anual esperado pela propriedade.

6. CONCLUSÕES

O HoBi-like vírus pode causar alta mortalidade de bezerros com quadro clínico de gastroenterite e dermatite.

O quadro clínico e lesional encontrado nesse surto de mortalidade de bezerros associado ao HoBi-like é similar ao descrito em infecções agudas por cepas altamente virulenta de BVDV ou em casos de Doença das Mucosas.

A técnica RT-PCR com o primer panpestivirus 324/326 para região 5' UTR e o BD1 e BD3 para a Npro podem amplificar o HoBi-like vírus.

A técnica de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo D89 (VRMD) pode ser uma alternativa diagnóstica de animais PI e doentes por HoBi-like vírus

REFERENCIAS

ÁLVAREZ, M.; DONATE, J.; MAKOSCHEY, B. Antibody responses against non- 446 structural protein 3 of bovine viral diarrhoea virus in milk and serum samples 447 from animals immunised with an inactivated vaccine. **Veterinary Journal**, v.191, n.448, p. 371–376, 2012.

BAKER JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infections. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**, v.11, p.425–445, 2005.

BAUERMANN, F.V.; FLORES, E.F.; RIDPATH, J.F. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p.253–261, 2012.

BAUERMANN, F.V.; RIDPATH J.F.; WEIBLEN, R.; FLORES E F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v.25, n.1, p 6-15, 2013.

BAULE, C. et al. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhea virus type I. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 146-153, 2001.

BECHER, P.; ORLICH, M.; SHANNON, A.D.; HORNER, G.; KONIG, M.; THIEL, H.J., Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. **Journal General Virology**, v.78, p.1357–1366, 1997.

BECHER, P.; RAMIREZ, R.A.S.; ORLICH, M.; ROSALES, S.C; KOSMIDOU, A.; KONIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRMEIER, H.; THIEL, H.J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v.311, p. 96–104, 2003.

BECHER, P.; SHANNON, A.D.; TAUTZ, N.; THIEL, H.J. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. **Virology**, v.198, p. 542–551,1994.

BENNETT, R.M, ; KHRISTIANSENN, K.; CLIFTON-HEDLEY, R.S. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. **Journal of Dairy Research** (1999) **66** 455±459.

BACHOFEN, C.; STALDER, H.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Veterinary Microbiology**, v.131, p. 93–102, 2008.

BACHOFEN, C.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; STALDER, H.; PETERHANS, E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary Microbiology**, 1994.

BIANCHI, E.; MARTINS, M.; WEIBLEN. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000–2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 649–655, 2010.

BINTINTAN I.; MEYERS G. A new type of signal peptidase cleavage site identified in an RNA virus polyprotein. **Journal Biology Chemical**, v. 285, p. 8572– 8584, 2010.

BYERS, SR.; EVERMANN, JF.; BRADWAY, DS.; GRIMM, AL.; RIDPATH, JF.; PARISH S.M.; TIBARY, A.; BARRINGTON, GM. The effects of exposure of susceptible alpacas to alpacas persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n.3, p.263-71, 2011.

BUONAVOGLIA, C.; MARSILIO, F.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, D.; CAVALLI, A. Persistent pestivirus infection in sheep in Apulia (southern Italy). **New Microbiology**, v.17, p.163–165, 1994.

BRODERSEN, B.W. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 85-93, 2004.

CHASE C.C.L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A.A.A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**, v.20, p. 95–114, 2004.

CORREA W.V.; NETO L.Z.; BARROS H.M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 35, n. 4, p.141-151, 1968.

CAMPEN H.C.; RIDPATH, J.; WILLIAMS. E.; CAVENDER, J.; EDWARDS, J.; SMITH, S.; SAWYER., H. Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. **Journal Wildlife Diseases**, v. 37, n. 2, p. 306-11, 2001.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, MB.; DE CASTRO, AMMG. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, p.211–216, 2006.

COLLOFF, A.P.; WATSON, J.; PAUL DUFF, S. Haemorrhagic disease in cattle with genotype 1 bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Record**, v.13, p.171-530, 2012.

CORBIÈRE, F.; POUGET, C.; BERNARDIN, E.; BRUGIDOU, R.; SCHELCHER, F. Short communication: performance of a blocking antibody ELISA and tank milk test for detection of dairy sheep flocks exposed to border disease virus.

Journal Dairy Science, v. 95, n.11, p-6542-5.

CRAIG, M.I.; VENZANO, A.; KÖNIG, G.; MORRIS, W.E.; JIMÉNEZ, L.; JULIÁ, S.; CAPELLINO, F.; BLANCO VIERA, J.; WEBER, E.L. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Research Animal Science**, v. 1, p.194-6, 2008.

CORNISH, T.E.; VAN OLPHEN, A.L.; CAVENDER, J.L.; EDWARDS, J.M.; JAEGER, P.T.; VIEYRA, L.L.; WOODARD, L.F.; MILLER, D.R.; O'TOOLE, D. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 110-115, 2005.

DECARO, N.; LUCENTE, M.S.; MARI, V.; AMORISCO, F.; COLAIANNI, M.L.; CORDIOLI, P.; PARISI, A.; LELLI, R.; BUONAVOGLIA, C. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1549–1552, 2011.

DECARO, N.; SCJARRETTA, R.; LUCENTE, M.S.; MARI, V.; AMORISCO, F.; COLAIANNI, M.L.; CORDIOLI, P.; PARISI, A.; LELLI, R.; Buonavoglia, C. A nested PCR approach for unambiguous typing of pestiviruses infecting cattle. **Molecular Cellular Probes**, v.26, n.1, p.42-6, 2012a.

DECARO, N.; LUCENTE, M.S.; MARI, V.; SCJARRETTA, R.; PINTO, P.; BUONAVOGLIA, D.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. 2012. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. **Journal Clinical Microbiology**, v. 50, p.509–512.

DECARO, N.; MARI, V.; LUCENTE, M.S.; SCJARRETTA, R.; MORENO, A.; ARMENISE, C.; LOSURDO, M.; CAMERO, M.; LORUSSO, E.; CORDIOLI, P.; BUONAVOGLIA, C. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. **Veterinary Microbiology**, v.155, p.165-171, 2012c.

DECARO, N.; MARI, V.; LUCENTE, M.S.; SCJARRETTA, R.; MORENO, A.; ARMENISE, C.; LOSURDO, M.; CAMERO, M.; LORUSSO, E.; CORDIOLI, P.;

BUONAVOGLIA C. Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from a diseased animal. **Journal General Virology**, v. 93, n.9, p.1976-83, 2012d.

DECARO, N.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M.S.; SCARRETTA, R.; MARI, V.; LAROCCA, V.; ELIA, G.; CAVALIERE, N.; MARTELLA, V.; FASANELLA, A.; BUONAVOGLIA, C. Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus **Journal Clinical Microbiology**, Jan 16, 2013 [Epub ahead of print].

DEREGT, D.; CARMAN, PS.; CLARK, RM.; BURTON, KM.; OLSON, WO.; GILBERT, SA. A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n.5, p. 433-437, 2002.

DOYLE, L.; G, HEUSCHELE, W. P. B.V.D.V. infection in captive exotic ruminants. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.183, p.1257, 1983.

DRISKELL, E.A.; RIDPATH, J.F. A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the united states from 2004 to 2005. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 6, p. 600-605, 2006.

EVERMANN, J.F. Pestiviral infection of llamas and alpacas. **Small Ruminant Research**, v. 61, n. 2-3, p. 201-206, 2006.

EDMONDSON, M.A. GIVENS, MD.; WALZ, PH.; GARD, JA.; STRINGFELLOW DA, CARSON, RL. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n.4, p. 376-381, 2007.

FLORES, E.F.; SCHUCH, L.F.D. Diarréia viral bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**, 3th Ed, Santa Maria: Pallotti, v. 1, p. 81-93, 2007.

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

FREDRIKSEN, B.; PRESS, CM.; LØKEN, T.; ODEGAARD, SA. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 109-122, 1999.

FULTON, R.W.; SALIKI, J.T.; CONFER, A.W.; BURGE, L.J.; D'OFFAY J.M.; HELMAN, R.G.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; PAYTON, M.E. Bovine viral diarrhea cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 1, p.33-38, 2000.

FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; ORE, S.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; BURGE L.J, PAYTON M.E. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic in laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, e 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 1-2, p. 35-40, 2005.

FULTON, R.W.; WHITLEY, E.M.; JOHNSON, B.J.; RIDPATH, J.F.; KAPIL, S.; BURGE L.J.; COOK, B.J.; CONFER, A.W. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p.283-291, 2009.

GALLEI, A.; BLOME, S.; GILGENBACH, S.; TAUTZ, N.; MOENNIG, V.; BECHER, P.; Cytopathogenicity of classical swine fever virus correlates with attenuation in the natural host. **Journal Virology**, v. 82, p.9717–9729, 2008.

GOYAL, S.M. Diagnosis. In: Goyal, S.M & Ridpath, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa:Blackwell Publishing, cap. 12, p. 197-208, 2005.

GOENS, S.D. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 12, p. 946-954, 2002.

GROM, J.; BARLIC-MAGANJA D. Bovine viral diarrhoea (BVD) infections – control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.259-264,1999.

GROOMS D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics North American Food Animal Practice**, v.20, n. 1, p.5-19, 2004.

GROOMS D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogoly**, v. 66, n.3, p.624-628, 2006.

GUNN, G.J.; SAATKAMP, H.W.; HUMPHRY, R.W.; STOTT, A.W. Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, p.149–162, 2005.

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

HAMMERS, C.; Dehan, P.; Couvreur, B.; Letellier, C.; Kerkhofs, P.; Pastoret P.P. Diversity among bovine pestiviruses. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 112-122, 2001.

HESSMAN, B.E.; SJEKLOCHA, D.B.; FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; JOHNSON, B.J.; MCELROY, D.R. Acute bovine viral diarrhoea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, p. 397-404, 2012.

HILBE, M.; GIRAO, V.; BACHOFEN, C.; SCHWEIZER, M.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. Induced Mucosal Disease Lesions: A Histological, Immunohistological, and Virological Investigation. **Veterinary Pathology**, v. 50, n.1, p.46-55, 2013.

HOUE H, Meyling A: Prevalence of bovine virus diarrhoea in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early-pregnancy. **Preventive Veterinary Medical**, v. 11, p.9-16, 1991.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 1-3, p. 89-107, 1999.

JUBB, K.V.F.; HUXTABLE C. R. The Nervous system. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. **Pathology of domestic animals**, 4.ed. San Diego : Academic, p.289-291, 1993.

KARAOĞLU, T.; BURGU, I.; ÖZKUL, A. Biotypic characterisation of bovine viral diarrhoea virus (bvdv) using reverse transcription-polymerase chain reaction (rt-pcr) in clinical samples. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.51 ,n.3, p. 425–431, 2003.

KIRKLAND, P.D.; FROST, M.J.; FINLAISON, D.S.; King, K.R.; Ridpath, J.F.; Gu X. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. **Virus Research**, v.129, p.26–34, 2007.

KOZASA, T.; AOKI, H.; NAKAJIMA, A.; FUKUSH, A.; ISHIMARU, M.; NAKAMURA, S. Methods to select suitable fetal bovine serum for use in quality control assays for

the detection of adventitious viruses from biological products. **Biologicals**, V. v. 39, p.242-248, 2011.

LACKNER, T., A. MÜLLER, A. PANKRAZ, P. BECHER, H.-J. THIEL, A. E. GORBALENYA, AND N. TAUTZ. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. **Journal Virology**, v. 8, p.10765–10775, 2004.

LACKNER T, MÜLLER A, KÖNIG M, THIEL H-J, TAUTZ N. Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. **Journal Virology**, v. 79, p. 9746 –9755, 2005.

LAMP, B, RIEDEL, C, ROMAN-SOSA,G, HEIMANN, M, JACOBI, J, BECHER, P, THIEL, H.J AND RUMENAPF ,T. Biosynthesis of Classical Swine Fever Virus Nonstructural Proteins . **Journal of Virology**, v 85, n.7, p.3607–3620, 2011.

LARSKA., M, POLAK., M.P, LIU., L, ALENIUS., S, UTTENTHAL., A. Comparasion of the performance of five different immunoassayas to detect specific antibo dies against merging atypical bovine pestivirus. **Journal. Virology. Methods**, v. 187, n.1, p.103-9, 2013.

LARSKA., M, POLAK., MP, RIITHO., V, STRONG., R, BELÁK., S, ALENIUS., S, UTTENTHAL.,Å, LIU.,L.Kinetics of single and dual infection of calves withan Asian atypical bovine pestivirus anda highly virulent strainof bovine viral diarrhoea virus 1. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v.35, n.4, p.381-90, 2012.

LAUREYNS.,J, LETELLIER, C, MEGANCK, V, PARDON,B, DEPREZ,P, KRUIF.,A. Severe disease in neonatal calves with. detection of cytopathic BVDV **Veterinary Record**, v.169, p. 101-102, 2011.

LAUREYNS J, RIBBENS S, DE KRUIF A .Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. The **Veterinary Journal**, v.184, n.1, p.21-6, 2010.

LIEBLER-TENORIO. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**, Iowa:Blackwell Publishing, cap. 7, p. 121-144, 2005.

LINDBERG A, BROWNLIE J, GUNN GJ, HOUE H, MOENNIG V, SAATKAMP HW, SANDVIK T, VALLE PS. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. **Rev Science Technology** , v.25, p. 961-979, 2006.

LINDBERG AL, ALENIUS S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.197-222, 1999.

LINDENBACH, B.D., THIEL, H.-J., RICE, C.M. **Flaviviridae: the viruses and their replication**. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1, 5th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, p. 1101–1152, 2005.

LIU, L., XIA, H., BAULE, C. Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1111-1116, 2009a.

LIU L, XIA H, BELÁK S, BAULE C. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. **Journal Virology Methods**, v. 158, p.82-5, 2008.

LUNARDI, M.; HEADLY, S.A.; LISBOA, J.A.N.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research. in Veterinary Science**, v. 85, p. 599–604, 2008.

MAO L, LI W, ZHANG W, YANG L, JIANG J. 2012. Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. **Journal Virology**, v. 86, n.22,p.124-44.

MILLER, M.A. et al. Effects of delayed or prolonged fixation on immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus type 1 in skin of two persistently infected calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 5, p. 461-463, 2005.

NEILL.,J.D, NEWCOMER.,B.W, MARLEY., S.D,RIDPATH., J.F, GIVENS., D. Greater numbers of nucleotide substitutions are introduced into the genomic RNA of bovine viral diarrhoea virus during acute infections of pregnant cattle than of nonpregnant cattle. **Virology Journal**, v. 6, n.9, p.150, 2012.

NEILL JD. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v.41, n.1, p.2-7, 2013 .

NJAA BL, CLARK EG, JANZEN E, ELLIS JA, HAINES DM. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p.393-9, 2000.

NEWCOMER BW, MARLEY MS, RIDPATH JF, NEILL JD, BOYKIN DW, KUMAR A, GIVENS MD. Efficacy of an antiviral compound to inhibit replication of multiple pestivirus species. **Antiviral Research**, V.96, n.2, p. 127-9, 2012.

ODEÓN., A.S, RISATTI.,G, KAISER.,G.G, LEUNDA.,M.R, ODRIOZOLA .,E, CAMPERO.,C.M, DONIS, R.O. Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p.133–144, 2003.

OLAFSON, P.; MCCALLUM, A.; FOX, F. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinary**, v. 36, p. 205–213, 1946.

PASSLER, T.; WALZ, P.H. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. **Animal Health Research Reviews**, v. 3, p. 1-5, 2009.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TIJSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v.203, p.260-268, 1994.

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p.18–25, 2010A.

PETERHANS, E.; BACHOFEN,C.; STALDER,H.; SCHWEIZER, S. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (bvdv): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v. 41, p. 44, 2010B.

PIETSCHMANN, T., V. LOHMANN, G. RUTTER, K. KURPANEK, AND R. BARTENSCHLAGER. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. **Journal Virology**, 75, p.1252–1264, 2001.

PELETTI S, ZUCCON F, PITTI M, ET AL. Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. **Research veterinary science**, v. 92, p.147-150, 2010.

POTIGIETER, L.N.D.. Bovine viral diarrhea, p. 313-319. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock in south Africa**. 3 ed. Oxford University. 2004.

PROPHET E.B., MILLS B., ARRINGTON J.B. & SOBIN L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p. 1992.

RADOSTITIS, O.M. et al. **Veterinary medicine**, 9.ed. London : Saunders, 2000. 1877p.

RAMOS-VARA JA. Principles and methods of immunohistochemistry. **Methods Mol Biol**, v.691, p.83-96, 2011.

RAUE, R.; HARMEYER, S.S.; NANJIANI, I.A. Antibody responses to inactivated vac-511 cines, natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits. 512 Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. **Veterinary Journal**, v. 187,p. 330–334, 2011.

RIDPATH, J. F., BOLIN, S. R., AND DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74,1994.

RIDPATH, J.F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 127-131, 2003.

RIDIPATH, J.F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa:Blackwell Publishing, cap. 3, p. 65-80, 2005.

RIDPATH, J.F. et al. Multiple outbreaks of acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n.3-4, p. 196-204, 2006.

RIDPATH, J.F; FLORES, E.F. **Flaviviridae**. In: FLORES, E.F. (Org) *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, cap. 22. p. 563-592, 2007.

RIDPATH., JF, NEILL., JD, CHASE., CC. Impact of BVDV infection of white-tailed deer during second and third trimesters of pregnancy. **Journal Wildlife Diseases**, v. 48,n. 3, p.758-62, 2012.

RIDPATH J .Preventive strategy for BVDV infection in North America. **Jpn Journal Veterinary Research**, v. 6, p.S41-9, 2012.

RIDPATH JF. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**, v.41, n.1,p.14-9, 2013

RODNING SP, GIVENS MD, MARLEY MS, ZHANG Y, RIDDELL KP, GALIK PK, HATHCOCK TL, GARDJA, PREVATT JW, OWSLEY WF. Reproductive and economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus into a naive group of heifers. **Theriogenology**, v.15-78, n.7, p.1508-16. 2012.

RÜMENAPF, T., THIEL, H.-J., Molecular biology of pestiviruses. In: Mettenleiter, T.C., Sobrino, F. (Eds.), **Animal Viruses: Molecular Biology**, Caister Academic Press, Norwich, UK, ISBN: 978-1-904455-22-6, 2008.

SALIKI, J.T & DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Veterinary Clinics North American Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 69-83, 2004.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigation for bovine viral diarrhoea virus in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.

SANTOS, A.S.; ANTONIASSI, N.A.B.; BOABAID, F. M.; BITENCOURT, A.P.G.; ALMEIDA, L.L.; CANAL, W.C.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.10, p.885-892, 2011.

SCHIRRMIEIER, R H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal General Virology**, v. 85, p.3647–52. 2004.

STAHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON, WADMAN, A.; BAULE C.; AIUMLAMAI, S.; BELÁK S. Natural infection of cattle with an atypical “HoBi”-like pestivirus—implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v.38, p.517–523, 2007.

STAHL, K.; BEER, M.; SCHIRRMIEIER, H.; HOFFMANN B.; BELÁK S.; ALENIUS S. Atypical ‘Hobi’- like pestiviruses—recent findings and implications thereof. **Veterinary Microbiology**, v.142, p.90–93, 2010.

STÅHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe—an update. **Jpn J Vet Res**. v. 60, p.S31-9, 2012.

STALDER, H.P.; MEIER, P.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RÜFENACHT J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H.R.; PETERHANS E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medical**, v.72, p.37–41, 2005.

SULLIVAN, D.G.; CHANG, D.J.; AKKINA, R.K. Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. **Virus Research**, v.47,p. 19–29, 1997.

TAJIMA, M.; DUBOVI, E.J. Genetic and clinical analysis of bovine viral diarrhea virus isolates from dairy operations in the United States of America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 1, p. 10-15, 2005.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. **Mol Biol Evol.**, v. 24, p.1596–9. doi:10.1093/molbev/msm092, 2007.

TAUTZ, N.; HARADA, T.; KAISER, A.; RINCK, G.; BEHRENS, S.E.; THIEL, H.J. Establishment and Characterization of Cytopathogenic and Noncytopathogenic Pestivirus Replicons. **Journal of Virology**, v.73, n.11, p. 9422–9432, 1999.

TAYLOR, L.F.; VANDONKERSGOED, J.; DUBOVI, E.J.; HARLAND, R.J.; VANDENHURK, J.V.; RIBBLE, C.S.; JANZEN E.D. The prevalence of bovine viral diarrhea virus infection in a population of feedlot calves in Western Canada. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 59, p.87-93, 1995.

THUR, B.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. **Zentralb Veterinarmed**.v.43, p.163-6., 1996.

THURMOND, M.C. Virus Transmission. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell Publishing, cap. 5, p. 91-104, 2005.

TINSLEY, M.; LEWIS, F.I.; BRÜLISAUER, F. Network modeling of BVD transmission. **Veterinary Research**, v.43, n.1, p.11., 2012.

VAN REGENMORTELT, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. 2000, **Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego, CA.

VIJAYARAGHAVAN, B.; XIA, H.; HARIMOORTHY, R.; LIU, L.; BELÁK, S.; Evaluation of 540 envelope glycoprotein Erns of an atypical bovine pestivirus as antigen in a 541 microsphere immunoassay for the detection of antibodies against bovine viral 542 diarrhea virus 1 and atypical bovine pestivirus. **Journal of Virological Methods**, v. 543, n. 158, p.193–198, 2012.

VILCEK, S.; HERRING, A. J.; HERRING, J. A.; NETTLETON, P. F.; LOWINGS J. P.; PATON, D. J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives Virology**, v.136,p.309–323, 1994.

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F.; PATON, D.J.; BELA´ K, S.; Molecular characterization of ovine pestiviruses. **Journal General Virology**, v. 78, p.725–735, 1997.

VILCEK, S.; BJO RKLUND, H.V.; HORNER, G.W.; MEERS, J.; BELA´ K, S. Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. **N. Z. Vet. J**, v. 46, p.35–37, 1998.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives Virology**. v. 146,p. 99–115, 2001.

VILCEK, S.; RIDPATH, J.F.; VAN CAMPEN, H. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**,v.108, p.187–193, 2005.

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary Microbiology** , v.116, p.1–12, 2006.

XIA, H.; LARSKA, M.; GIAMMARIOLI, M.; DE MIA, GM.; CARDETI, G.; ZHOU, W.; ALENIUS, S.; BELÁK, S.; LIU, L. Genetic detection and characterization of Atypical bovine Pestiviruses in foetal bovine sera claimed to be of Australian origin. **Transbound Emerging Diseases**, doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01341.x. [Epub ahead of print], 2012.

XIA, H.; LIU, L.; NORDENGRAHN, A.; KISS, I.; MERZA ERIKSSON R.; BLOMBERG, J.; BELAK, S.A. Microsphere-based immunoassay for rapid, sensitive detection of 550 bovine viral diarrhea virus antibodies. **Journal of Virological Methods**, v. 168, n. 551, p. 18–21, 2010.