



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**SOROLOGIA COMPARATIVA PARA PESTIVIRUS DE RUMINANTES EM  
REBANHOS BOVINOS DO NORDESTE BRASILEIRO**

**Dissertação de Mestrado**

**DANIELA ELIETE PUHL**

**Porto Alegre  
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**SOROLOGIA COMPARATIVA PARA PESTIVIRUS DE RUMINANTES EM  
REBANHOS BOVINOS DO NORDESTE BRASILEIRO**

**Autora: Daniela Eliete Puhl**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de grau de Mestra em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária, subárea Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Virologia.

**Orientador: Cláudio Wageck Canal**

**Porto Alegre  
2019**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Puhl, Daniela Eliete  
SOROLOGIA COMPARATIVA PARA PESTIVIRUS DE RUMINANTES  
EM REBANHOS BOVINOS DO NORDESTE BRASILEIRO / Daniela  
Eliete Puhl. -- 2019.  
61 f.  
Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Anticorpo. 2. EVDV. 3. Pestivirus. 4. Vírus  
neutralização. 5. Bovino. I. Canal, Cláudio Wageck,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Daniela Eliete Puhl

SOROLOGIA COMPARATIVA PARA PESTIVIRUS DE RUMINANTES EM  
REBANHOS BOVINOS DO NORDESTE BRASILEIRO

Aprovada em 08 de março de 2019

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Ravazzolo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Mauro Riegert Borba

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Membro da Comissão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Franciele Maboni Siqueira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Membro da Comissão

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e às minhas irmãs, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e nas minhas crenças de que podemos fazer o mundo um lugar melhor, com nossas habilidades e paixões. À minha sobrinha e afilhada Bianca, que desperta em mim o desejo de ser uma humana melhor a cada dia e lembrar-me que todos nascemos cientistas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Cláudio Wageck Canal por sua orientação e por ter acreditado em mim, cedendo a oportunidade de aprendizado constante. À Dr<sup>a</sup> Andrea Henzel pelas portas abertas. Ao Me. Willian Pinto Paim pela divisão de sua expertise. À Ma. Raíssa Canova, por toda a disponibilidade para a bancada durante o desenvolvimento do trabalho e pela amizade desenvolvida. Ao Dr. Matheus Nunes Weber e à Dr<sup>a</sup> Renata da Fontoura Budaszewski pelas informações valiosas. Ao Dr. Samuel Paulo Cibulski por todo o apoio e compartilhamento dos seus conhecimentos. Aos meus colegas de laboratório, que me auxiliam diariamente a ser uma profissional e um ser humano melhor. Às agências de fomento à pesquisa, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

*Now, don't hang on  
Nothing lasts forever but the earth and sky  
It slips away  
And all your money won't another minute buy*

*Dust in the wind  
All we are is dust in the wind*

Kansas – Dust in the wind

## RESUMO

A diarreia viral bovina (BVD) é uma importante enfermidade, sendo responsável por perdas econômicas em rebanhos de todo o mundo. A BVD é causada por três espécies do gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae*, sendo eles o vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1), BVDV-2 e BVDV-3. Os pestivírus apresentam grande variabilidade genética e antigênica entre as espécies virais, o que pode levar a falhas no diagnóstico e na imunização. O presente trabalho investigou a diversidade de pestivírus de bovinos de amostras da Região Nordeste brasileira através da técnica de vírus neutralização (VN) comparativa e reação de RT-PCR seguida de sequenciamento dos produtos de amplificação. Seiscentas amostras de soro foram testadas por VN contra cepas de BVDV-1, -2 e -3 e comparou-se os títulos obtidos contra cada espécie. Como resultado, 26% (156/600) das amostras apresentaram-se soropositivas, sendo que 14,3% (86/600) apresentaram maiores títulos de anticorpos (mais que quatro vezes) contra o BVDV-2, 5,3% (32/600) contra o BVDV-1 e 3,3% (20/600) contra o BVDV-3. Além disso, 1,5% (9/600) apresentaram título (inferior a quatro vezes) contra mais de uma cepa, não sendo possível definir a cepa para qual a amostra é de fato soropositiva, o que foi observado entre BVDV-1 e -2, BVDV-1 e -3 e BVDV-2 e BVDV-3 em 0,7% (4/600), 0,5% (3/600) e 0,3% (2/600) amostras, respectivamente. Uma amostra (0,16%) foi positiva na RT-PCR e o sequenciamento indicou identidade de 97,6% com uma cepa de BVDV-3. A maior soroprevalência para BVDV-2 no Nordeste do País observada no presente estudo contrasta com a maior frequência de BVDV-1 relatada na maioria do mundo, além da maior frequência de BVDV-3 relatada na mesma região em trabalho prévio utilizando RT-PCR e sequenciamento. Os dados expostos no presente estudo reforçam a necessidade de revisão das vacinas contra a BVD utilizadas no País que deveriam conter BVDV-1, -2 e -3.

Palavras-chave: Anticorpo, BVDV, pestivírus, vírus neutralização, bovino.



## ABSTRACT

*Bovine viral diarrhea (BVD) is an important disease, accounting for economic losses in herds around the world. BVDV is caused by three species of the genus Pestivirus of the Flaviviridae family, including BVDV-1, BVDV-2 and BVDV-3. Pestiviruses show great genetic and antigenic variability among viral species, which can lead to failures in diagnosis and immunization. The present work investigated the bovine pestivirus diversity of samples from the Brazilian Northeast region through the comparative virus neutralization (VN) and RT-PCR reaction followed by sequencing the amplification products. Six hundred serum samples were tested by VN against BVDV-1, -2 and -3 strains and the titers obtained against each species were compared. As a result, 26% (156/600) of the samples were seropositive, and 14.3% (86/600) presented higher antibody titres (more than fourfold) against BVDV-2, 5.3% (32/600) against BVDV-1 and 3.3% (20/600) against BVDV-3. In addition, 1.5% (9/600) presented titre (less than fourfold) against more than one strain, and it is not possible to define the strain for which the sample is actually seropositive, which was observed between BVDV-1 and -2, BVDV-1 and -3 and BVDV-2 and BVDV-3 in 0.7% (4/600), 0.5% (3/600) and 0.3% (2/600) samples, respectively. A sample (0.16%) was positive on RT-PCR and the sequencing indicated 97.6% identity with a BVDV-3 strain. The greater seroprevalence for BVDV-2 in the Northeast of the country observed in the present study contrasts with the higher frequency of BVDV-1 reported in most of the world, besides the higher frequency of BVDV-3 reported in the same region in previous work using RT-PCR and sequencing. The data presented in this study reinforce the need to review BVDV-1, -2 and -3 vaccines against BVDV in the country.*

*Keywords: Antibody, BVDV, pestivirus, virusneutralization, cattle.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Filogenia da família *Flaviviridae*. 18
- Figura 2: Árvore filogenética do gênero *Pestivirus*. 20
- Figura 3: Descrição esquemática da estrutura de um vírion do gênero *Pestivirus*. 22
- Figura 4: Esquema de organização do genoma de pestivírus. 23
- Figura 5: Consequências de infecção persistente pelo BVDV. 25
- Figura 6: Mapa do Brasil indicando os estados do Maranhão e Rio Grande do Norte com uma estrela preta. (Fonte: Google Maps) 29
- Figura 7: Diagrama de Venn com os resultados da VN representando a proporção de amostras positivas contra cada espécie viral. 1
- Figura 8: Árvore filogenética baseada na região do gene da proteína E2 das sequências das espécies de pestivírus BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3. 3

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies do gênero *Pestivirus* de acordo com nova classificação designada pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral e sua denominação anterior (ICTV). 19

Tabela 2: Títulos de anticorpos neutralizantes determinados na vírus-neutralização contra cepas de BVDV-1, -2 e -3 em soro de bovinos testados no presente estudo. 1

## LISTA DE ABREVIATURAS

VN Virus neutralização

CP Citopático

NCP Não Citopático

BVDV Bovine Viral Diarrhea Virus (Vírus da Diarreia Viral Bovina)

BVD Bovine Viral Diarrhea (Diarreia Viral Bovina)

RT-qPCR Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction  
(Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa)

cDNA complementar deoxyribonucleic acid

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 TAXONOMIA .....	16
2.2 VÍRION E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA .....	19
2.3 BIOTIPOS .....	21
2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS .....	22
2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	23
2.6 CONTROLE E PREVENÇÃO .....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. AMOSTRAS .....	25
3.2. CULTIVO CELULAR E ENSAIOS DE VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO (VN).....	25
3.3. ISOLAMENTO DE RNA E RT-QPCR .....	26
3.4. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	26
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
4.1. VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO .....	28
4.2. RT-QPCR, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	33
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes ao gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae* são pequenos vírus de genoma RNA de fita simples de 12,3 kilobases (Kb), envelopados, medindo entre 45 e 60 nm de diâmetro. Recentemente, uma proposta de mudança de nomenclatura foi apresentada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para fornecer um sistema de nomenclatura mais uniforme. Com isso, existem hoje 11 espécies reconhecidas e nomeadas de *Pestivirus A a K*, entre os quais o vírus da diarréia viral bovina tipo 1 (BVDV-1) foi renomeado como *Pestivirus A*, BVDV-2 como *Pestivirus B*, e o vírus Hobi ou BVDV-3 como *Pestivirus H* (SIMMONDS et al., 2017).

Os pestivírus apresentam grande variabilidade genética, sendo que entre os pestivírus de bovinos (BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3) foram propostas classificações em subtipos baseadas em sequências da 5' UTR e N<sup>pro</sup> (NAGAI et al., 2004; RIDPATH et al., 1994;). O BVDV-1 possui até 21 subtipos (1a até 1u), o BVDV-2 até três (2a até 2c) e o BVDV-3, quatro (3a até 3d). Tais classificações podem funcionar como marcadores epidemiológicos de localidade e há relatos na literatura de que há diferenças na reatividade sorológica cruzada entre os diferentes subtipos (RIDPATH, 2003). No Brasil, há relatos da presença de BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3, onde o BVDV-1a parece ser o mais frequente na região Sul (WEBER et al., 2014) e o BVDV-3 na região Nordeste (SILVEIRA et al., 2017).

Os pestivírus de bovinos também podem infectar outros ruminantes domésticos e silvestres, além de suínos e javalis (SIMONDS et al., 2017).

O BVDV está associado, desde uma doença subclínica leve, à síndrome hemorrágica aguda grave (STOFFREGEN et al., 2000), sendo também comumente associado a casos de doença respiratória bovina em conjunto com outros patógenos respiratórios primários e oportunistas (HAY et al., 2016). O BVDV infecta a maioria dos órgãos do hospedeiro, incluindo os sistemas respiratório, imunológico, digestivo e reprodutivo. Se a infecção ocorre no início da gestação, o bezerro resultante pode nascer persistentemente infectado (PI) (FULTON et al., 2009b). Esses animais geralmente são animais refugio, com desenvolvimento retardado, e tornam-se portadores permanentes que excretam o vírus continuamente em secreções e excreções durante toda sua vida, sendo considerados os principais responsáveis pela manutenção do vírus no rebanho (FLORES, 2017). Além disso, indivíduos PI vivem em média até dois anos, quando morrem por complicações causadas pela imunodepressão induzida pelo vírus ou de doença das mucosas, que é um quadro clínico desenvolvido quando o animal é superinfectado com cepa citopática de origem endógena ou exógena (FLORES, 2017).

Por possuir alta diversidade genômica e antigênica, o diagnóstico preciso do BVDV é obtido pela associação de diferentes testes (SANDVIK, 2004). Os testes moleculares, como a RT-PCR, possuem praticidade quanto ao tempo de resultado e quando acrescidos de sequenciamento podem fornecer informações como a espécie e subtipo viral.

Os testes sorológicos são excelentes para levantamentos epidemiológicos e monitoramento de rebanhos (LINDBERG, 1999). Entre eles, a vírus-neutralização (VN) é o teste sorológico de referência e pode ser muito específico e facilmente adaptável ao

genótipo prevalente através da escolha do vírus-semente (FLORES, 2017). Cabe ressaltar que os testes sorológicos podem apresentar valor limitado em rebanhos vacinados, podendo causar dificuldades na interpretação dos resultados, devido as diferenças antigênicas baseadas na neutralização cruzada, na ligação de anticorpo monoclonal (BACHOFEN, et al., 2008; PIZARRO-LUCERO et al., 2006; BOLIN et al., 1998) e na resposta dos animais PI à vacinação (FULTON et al., 2003).

O controle da infecção pelo BVDV baseia-se na identificação e eliminação dos animais PI, associada ou não com o uso de vacinas (BOLIN, 1995). Contudo, no Brasil, existem somente vacinas contendo BVDV-1a e BVDV-2a, e, de acordo com as pesquisas já realizadas, são de espécies não circulantes no país, o que pode gerar falhas na efetividade do programa. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo investigar a diversidade de pestivírus de bovinos de amostras do Nordeste brasileiro usando VN comparativa com espécies distintas de pestivírus de bovinos como vírus-semente e RT-PCR seguida de sequenciamento.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Taxonomia

A família *Flaviviridae*, da qual fazem parte inúmeros vírus de importância na saúde humana e animal, é composta por quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (Figura 1). Os vírus do gênero *Flavivirus* são transmitidos principalmente por artrópodes (arbovírus), contando com 53 espécies dentre as quais estão patógenos muito importantes para a saúde humana como o Vírus da Dengue, Vírus da Febre Amarela, Vírus da Encefalite Japonesa, Vírus do Oeste do Nilo e Vírus Zika. O gênero *Hepacivirus* é composto por 14 espécies, dentre as quais o mais antigo e importante é o *Hepacivirus* C (Vírus da hepatite C), que infecta humanos. As onze espécies descritas no gênero *Pegivirus* estão relacionadas a diversos hospedeiros, sendo que correlação entre estes vírus e algum tipo de patogenia ainda não foi relatada (SIMMONDS et al. 2011). Por fim, o gênero *Pestivirus* abriga onze espécies (*Pestivirus* A-K), sendo que a maioria destes tem relevância e impacto na saúde animal, não havendo importância ou impacto direto na saúde humana.

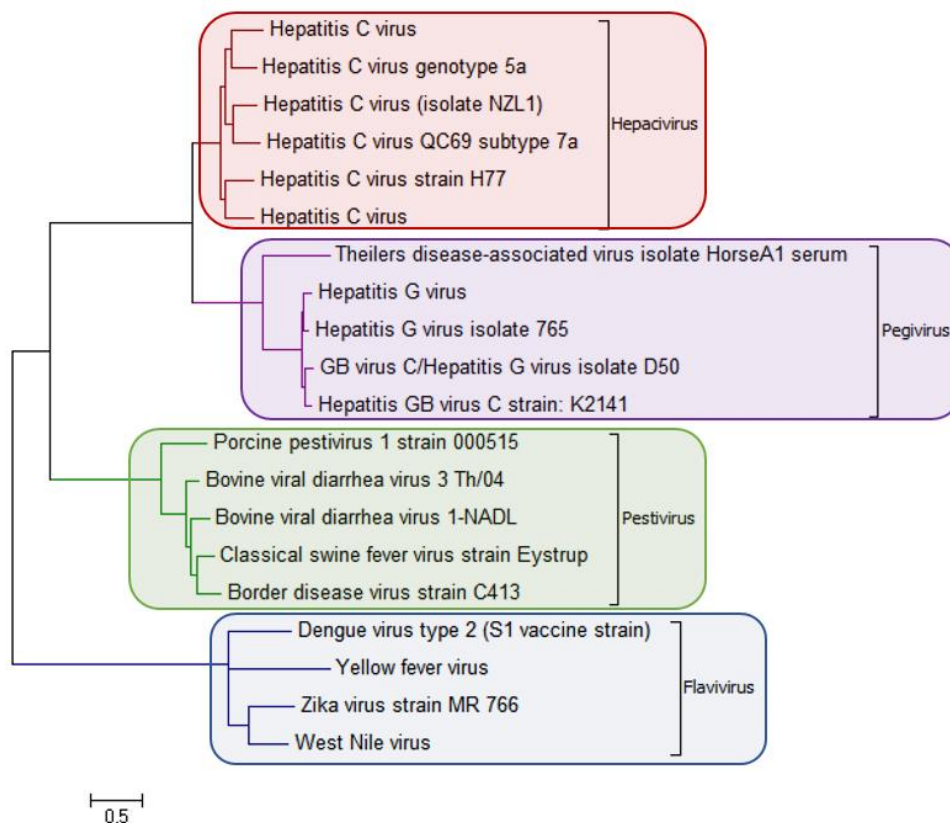


Figura 1: Filogenia da família *Flaviviridae*.



O gênero *Pestivirus* era oficialmente composto, até o ano de 2017, por quatro espécies reconhecidas: o Vírus da Diarreia Viral Bovina 1 e 2 (BVDV-1, -2), o Vírus da Doença da Fronteira (BDV) e o Vírus da Peste Suína Clássica (CSFV). Em 2018, a nomenclatura das espécies foi modificada, e outras possíveis novas espécies já descritas foram adicionadas oficialmente ao gênero, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (SIMONDS et al., 2017) (Tabela 1). Desta maneira, BVDV -1, BVDV-2, CSFV e BDV passaram a ser *Pestivirus A, B, C e D*, respectivamente. As possíveis novas espécies adicionadas ao gênero *Pestivirus* foram: *Pestivirus E* (VILCEK et al., 2005), *Pestivirus F* (KIRKLAND et al., 2015), *Pestivirus G* (AVALOS-RAMIREZ et al., 2001), *Pestivirus H*, anteriormente denominado Hobi-like (SCHIRRMEIER et al., 2004), *Pestivirus I* (OGUZOGLU et al., 2009), *Pestivirus J* (FIRTH et al., 2014) e *Pestivirus K* (HAUSE et al., 2015) (Tabela 1; Figura 2). Esta nova classificação foi feita com base na sequência de nucleotídeos do genoma completo, portanto duas novas prováveis espécies, um pestivírus descrito em morcego (WU et al., 2012) e pestivírus descritos em pequenos ruminantes na Tunísia (THABTI et al., 2005) não foram oficialmente reconhecidos como pertencentes ao gênero *Pestivirus* devido aos genomas estarem somente parcialmente sequenciados.

Tabela 1: Espécies do gênero *Pestivirus* .

Espécie	Denominação anterior	Cepa referência	Número de acesso	Abreviação
<i>Pestivirus A</i>	Vírus da Diarréia Viral Bovina 1	NADL	M31182	BVDV1
<i>Pestivirus B</i>	Vírus da Diarréia Viral Bovina 2	890	U18059	BVDV2
<i>Pestivirus C</i>	Vírus da Peste Suína Clássica	Alfort 187	X87939	CSFV
<i>Pestivirus D</i>	Vírus da Doença da Fronteira	X818	AF037405	BDV
<i>Pestivirus E</i>	Vírus Pronghorn		AY781152	PAPeV
<i>Pestivirus F</i>	Vírus Bungowannah	Bungowannah	EF100713	PPeV
<i>Pestivirus G</i>	Vírus de Girafa	H138	AF144617	GPeV
<i>Pestivirus H</i>	Vírus HoBi - like	Th/04_KhonKaen	FJ040215	HoBiPeV
<i>Pestivirus I</i>	Vírus Aydin - like	04-TR	JX428945	AydinPeV
<i>Pestivirus J</i>	Vírus de roedor	NrPV/NYC-D23	KJ950914	RPeV
<i>Pestivirus K</i>	Vírus Atípico Suíno	515	KR011347	APPeV

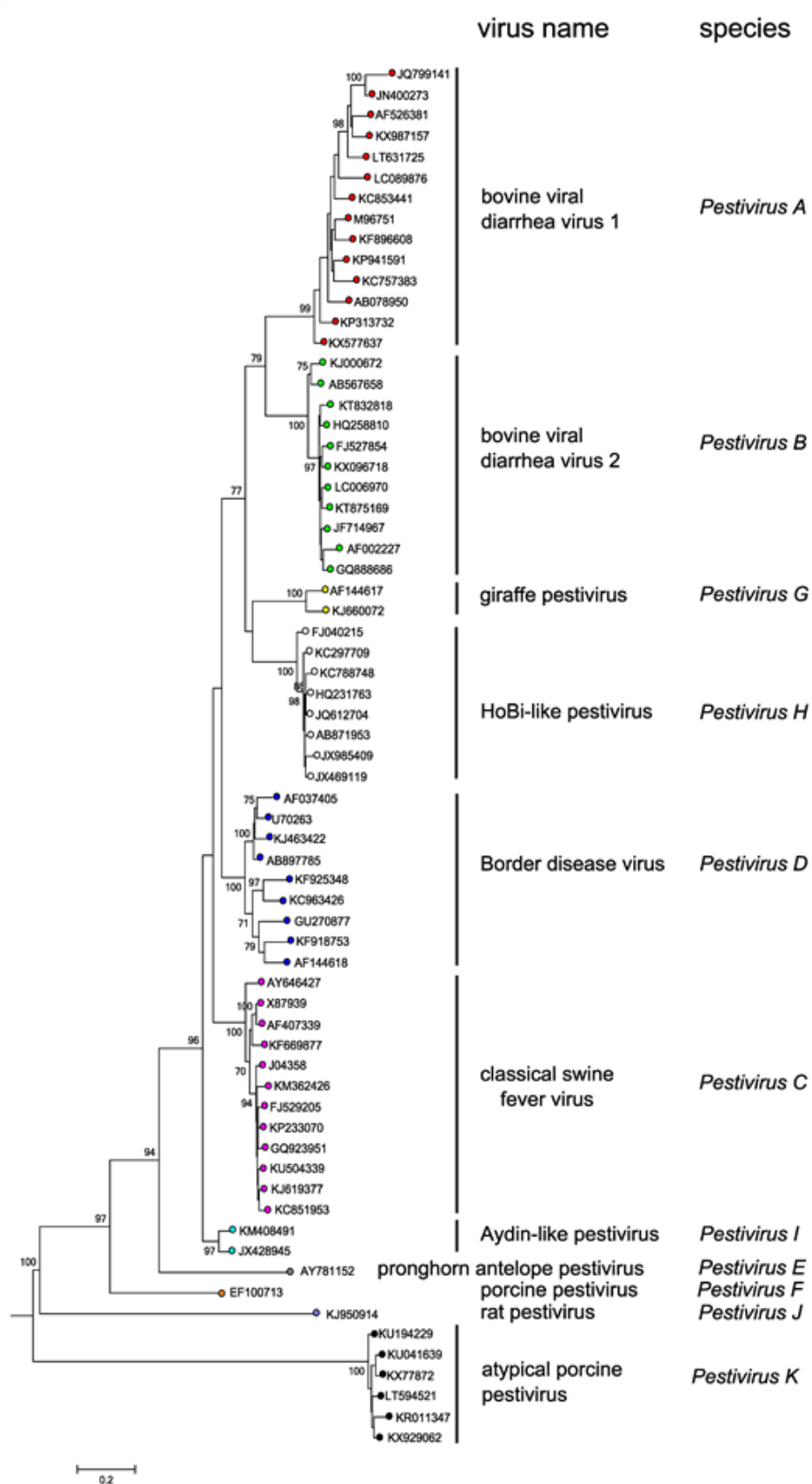


Figura 2: Árvore filogenética do gênero *Pestivirus*.

Uma característica única do gênero *Pestivirus* é a presença de duas proteínas exclusivas, a E RNase (E<sup>ms</sup>) e a proteína N-terminal (N<sup>pro</sup>), não sendo encontradas proteínas homólogas nem nos gêneros mais próximos, como *Flavivirus* e *Hepacivirus* (NEILL, 2013). Além disso, os isolados também podem ser classificados em biotipos citopático (cp) ou não-citopático (ncp), de acordo com a capacidade de produzir efeito citopático em cultivo celular (POCOCK et al., 1987). Já para a demarcação de espécies dentro do gênero, são consideradas como espécies diferentes as que apresentam no mínimo 25% de divergência de nucleotídeos no genoma completo. Podem auxiliar nesta demarcação entre espécies outros dois critérios: diferença de pelo menos 10 vezes no título de neutralização em testes de neutralização cruzada com soros imunes policlonais e gama de hospedeiros que podem ser infectados (ICTV, 2017).

Há importantes variações genéticas e antigênicas até mesmo dentro das espécies de pestivírus. A classificação de subgrupos dentro das espécies, apesar de não reconhecida pelo ICTV, é amplamente utilizada e feita de acordo com análises filogenéticas da sequência de nucleotídeos de regiões como a 5' não traduzida (5'UTR), Npro e E2, através dos métodos *Maximum likelihood* e análise Bayesiana (LIU et al., 2009). Com base em diversos estudos de filogenia, o *Pestivirus A* (BVDV-1), por exemplo, atualmente pode ser dividido em pelo menos 17 subtipos nomeados por ordem alfabética (A a Q) (DENG et al., 2012). O *Pestivirus B* (BVDV-2) é dividido em três subtipos (A a C) (FLORES et al., 2002), o *Pestivirus C* (BDV) em sete genótipos (1 a 7) (KAWANISHI et al., 2014) e o *Pestivirus D* (CSFV) em três genogrupos (1, 2 e 3) que se dividem em vários subgenótipos (POSTEL et al., 2013). Algumas das novas espécies incluídas no gênero também demonstram grande diversidade genética, como é o caso do *Pestivirus H* ('HoBi'-like), com três subtipos propostos de acordo com a origem geográfica das cepas (MISHRA et al., 2014) e do *Pestivirus K* (APPV), que apesar de descrito pela primeira vez em 2015, já tem relatada grande diversidade entre isolados (BEER et al., 2016). Estas divisões em subgrupos dentro das espécies devem-se a grandes variações genéticas entre as cepas, e a maior implicância prática destas variações é que as variações genéticas podem gerar baixa reatividade sorológica cruzada, levando a falhas vacinais e perda da habilidade de detecção dos testes de diagnóstico (RIDPATH, 2003). Visando facilitar a compreensão do texto, a partir de agora o *Pestivirus A* será chamado de BVDV-1, *Pestivirus B*, de BVDV-2 e *Pestivirus H*, de BVDV-3.

## 2.2 Vírion e organização genômica

Os vírions do gênero *Pestivirus* possuem 40–60 nm de diâmetro e têm formato esférico devido ao envelope composto de membranas da célula hospedeira (SIMMONDS et al., 2017). O capsídeo pode apresentar formato icosaédrico (Figura 3), porém sugere-se que a estrutura é polimórfica e sem formato definido (RIEDEL et al., 2017).

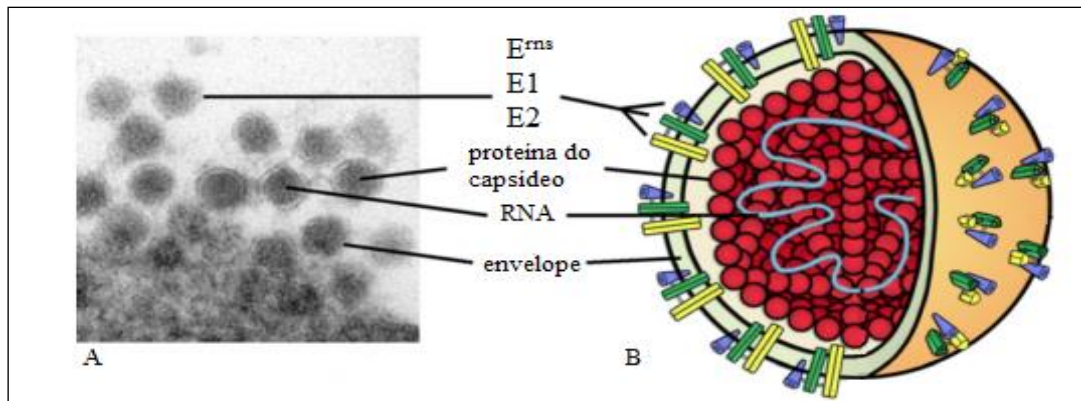


Figura 3: Descrição esquemática da estrutura de um vírion do gênero *Pestivirus*.

A) Foto de microscopia eletrônica de vírions do *Pestivirus C*. B) Ilustração esquemática do vírion. Adaptada de: Tautz et al. (2015).

Os pestivírus são vírus envelopados que têm o genoma constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva de 11,5 a 13 kilobases, possuindo duas regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3'. O genoma tem uma única fase aberta de leitura (ORF), que é traduzida em uma longa poliproteína de aproximadamente quatro mil aminoácidos. Esta poliproteína é posteriormente clivada em 11 a 12 proteínas, sendo quatro estruturais (E) e as demais não estruturais (NS) (KIRKLAND et al., 2015). A poliproteína é clivada em proteínas individuais à medida que é traduzida: proteína N (Npro), proteína do capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (Erns, E1 e E2), proteína 7 (p7) e as proteínas não-estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Figura 4) (SIMMONDS et al., 2017).

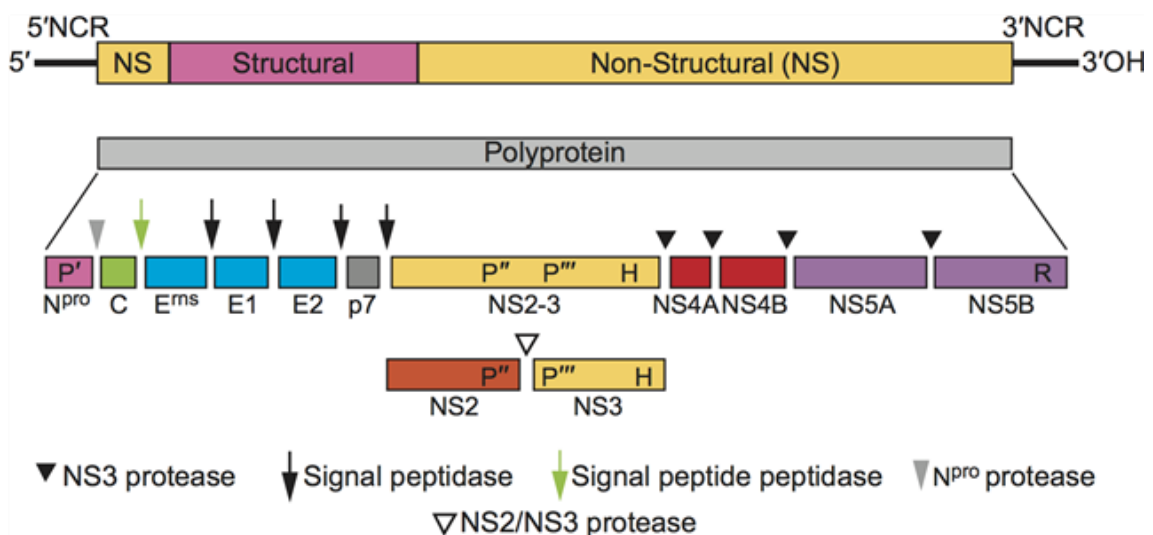


Figura 4: Esquema de organização do genoma de pestivírus.

O genoma dos membros da família *Flaviviridae* não possui estrutura *cap* na região 5' do genoma (BROCK et al., 1992), que tem função de interação com o ribossomo e sinalização de início da tradução. A estratégia para garantir a tradução do RNA utilizando a maquinaria celular do hospedeiro envolve a ligação dos ribossomos em uma estrutura secundária e terciária formada pelo RNA nesta região, denominada sítio interno de entrada no ribossomo (IRES). Neste sítio é sinalizada e iniciada a tradução (POOLE et al., 1995) e, por ser altamente conservada entre os pestivírus, a sequência de nucleotídeos é utilizada em análises filogenéticas (THURNER et al., 2004).

A primeira proteína viral traduzida é a proteína não estrutural N<sup>pro</sup>, que possui atividade autoproteolítica, sendo responsável pela própria clivagem da poliproteína (STARK et al., 1993). A N<sup>pro</sup> só é encontrada nos pestivírus e não possui homologia com nenhuma outra protease (RAWLINGS, et al., 2012) e, por interferir na via do Interferon tipo I (IFN), já foi associada à habilidade dos pestivírus de gerar infecções persistentes de fetos (CHARLESTON et al., 2001).

A E1 e E2 são proteínas integrais da membrana e fortemente inseridas a ela. A proteína E1 forma heterodímeros com a proteína E2 (THIEL et al., 1991), sendo que estes heterodímeros são necessários para a entrada do vírus na célula (RONECKER et al., 2008). Com base na proteína dos flavivírus, supõe-se que a função da E1 nos pestivírus é atuar como chaperona da proteína E2, que teria função de ligação a receptores celulares (LI et al., 2008). Embora seja uma glicoproteína do envelope, animais infectados não produzem anticorpos contra E1 e esta não é um alvo de linfócitos T (KIMMAN et al., 1993).

A proteína E2 possui características que a tornam capaz de realizar fusão de membranas, sendo indicada como uma das responsáveis pela entrada do vírus na célula (FERNÁNDEZ-SAINZ et al., 2014) e determinante do tropismo celular (LIANG et al., 2003). O receptor celular mais descrito e tido como principal receptor do Pestivirus A é o CD46 bovino, um cofator que protege a célula de um ataque inespecífico do sistema complemento (MAURER et al., 2004). Porém é suposto que os pestivírus necessitem de outros cofatores para entrada na célula, como receptores de heparan-sulfato (DRAGER, 2015).

### **2.3 Biotipos**

Os pestivírus podem apresentar dois biotipos: o biotipo NCP, que não causa destruição celular, e o biotipo CP, que causa a aparição de efeito característico nas células em cultivo. O biotipo NCP é o mais encontrado na natureza, sendo o único biotipo capaz de gerar animais persistentemente infectados, quando ocorre infecção intra-uterina. Nos isolados caracterizados como NCP, as proteínas virais NS2 e NS3 encontram-se em sua maioria na forma fusionada NS2-3; já o biotipo CP é originário de mutações, deleções e rearranjos genéticos que afetam a proteína viral NS2-3, que passa a ser clivada sob a forma de duas proteínas individuais (POCOCK et al., 1987). Várias mudanças no genoma já foram relatadas como formas de geração da NS2 e NS3 individuais: inserções de sequências celulares do hospedeiro, como a sequência Jiv (BECHER, 2011), duplicações

de sequências do próprio genoma (TAUTZ et al., 1996), deleções de parte do genoma (KUPFERMANN et al., 1996), mutações pontuais (KUMMERER, 2000) ou rearranjos dentro do genoma (MEYERS et al., 1992).

## **2.4 Patogenia e sinais clínicos**

A apresentação clínica e a severidade da doença dependem de características importantes, como genótipo e amostra viral, idade, status imunológico e reprodutivo do hospedeiro e infecções concomitantes com outros patógenos (RIDPATH, 2010). Apesar do termo “diarreia” compor o nome da enfermidade (diarreia viral bovina), sinais respiratórios e reprodutivos são mais comumente descritos (DUBOVI, 2011). Cabe ressaltar que ainda se sabe muito pouco acerca do quadro clínico causado por infecções com espécies atípicas de pestivírus (BVDV-3) em bovinos, mas sinais respiratórios e reprodutivos também parecem predominar (DECARO et al., 2012a; DECARO et al., 2012b; LARSKA et al., 2012).

A infecção pode resultar em infecção persistente, que ocorre quando o feto é infectado no terço médio de gestação (MACLACHLAN, 2011) (Figura 5). Os fetos infectados nesse período desenvolvem imunotolerância ao vírus e o seu organismo jamais consegue eliminá-lo. Esses animais geralmente são animais refugo, com desenvolvimento retardado, e tornam-se portadores permanentes que excretam o vírus continuamente em secreções e excreções durante toda sua vida, sendo considerados os principais responsáveis pela manutenção do vírus na natureza. Esses animais vivem cerca de dois anos, até morrerem de complicações causadas pela imunodepressão induzida pelo vírus ou de doença das mucosas, que é um quadro clínico desenvolvido quando o animal é superinfectado com cepa citopática de origem endógena ou exógena do vírus (FLORES, 2017). Com isso, a identificação e eliminação sistemática desses animais persistentemente infectados (PI) levaram ao êxito na erradicação desse agente em bovinos em alguns países europeus (LINDBERG, 1999).

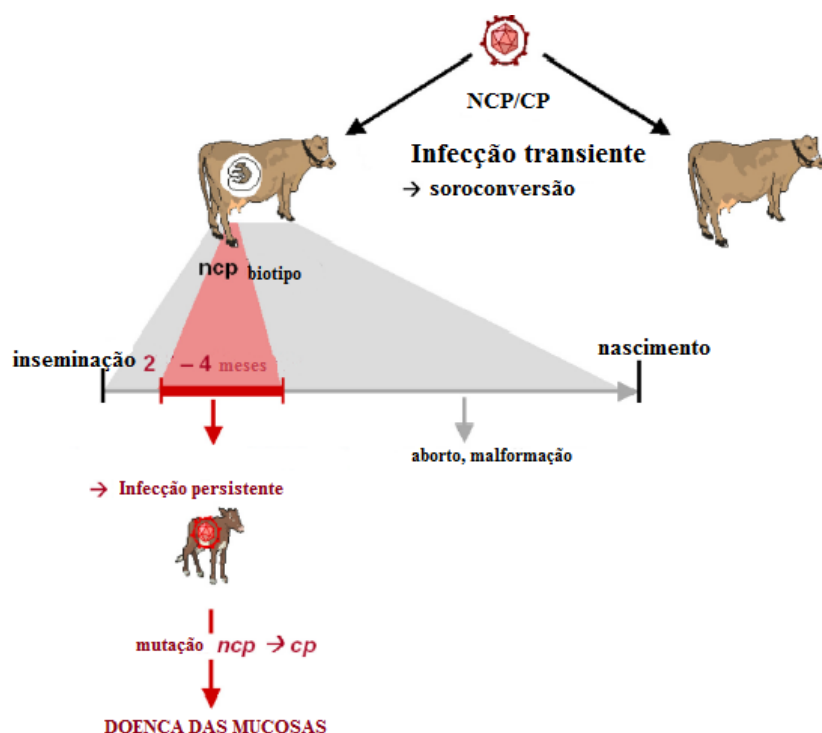


Figura 5: Consequências de infecção persistente pelo BVDV.

## 2.5 Métodos de diagnóstico

Os avanços recentes nas técnicas laboratoriais também contribuíram positivamente para as campanhas de controle e erradicação dos pestivírus. A combinação de diferentes técnicas de ELISA, imunistoquímica (IHC) e biologia molecular aprimoraram o diagnóstico individual e de rebanhos para pestivírus de ruminantes, permitindo o diagnóstico sistemático por detecção de anticorpos, antígenos ou genoma viral (OIE, 2008). Dentre os testes utilizados no diagnóstico, o isolamento viral (IV) é um teste confirmatório por excelência, porém necessita de amostras coletadas assepticamente e conservadas sob refrigeração, além de ser um teste laborioso e demorado (BRUM, 2007). A prova de imunistoquímica, cuja sensibilidade é de 100%, é realizada a partir de biópsia de pele da orelha, sendo indicada principalmente para identificação de bezerras PI (GROOMS, 2002). Os testes sorológicos são excelentes para levantamentos epidemiológicos e monitoramento de rebanhos. A SN é um teste sorológico de referência por ser muito específico e facilmente adaptável ao tipo de pestivírus de ruminantes presentes em cada região. Apesar disso, é uma técnica demorada, laboriosa e envolve obrigatoriamente cultivo celular e manipulação de vírus (BRUM, 2007). Já os testes de ELISA, tanto diretos, onde se busca o agente, com anticorpos específicos fixados em placas de 96 cavidades, como indiretos, onde se busca anticorpos, com o antígeno fixado nas placas, são as provas sorológicas mais apropriadas para analisar grande número de amostras porque são rápidos, práticos e biosseguros, embora a sensibilidade seja variável (SANDVIK, 2005).

As técnicas de biologia molecular são rápidas e possibilitam a identificação de variações genômicas mínimas e análises filogenéticas (VILCEK et al., 2001), porém, dependem da

integridade do genoma viral de RNA. A reação da transcriptase reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), baseada na região 5'UTR permite identificar o pestivírus de uma forma mais rápida quando comparada com as outras técnicas. Como diferencial, pode ser aplicada em diversos materiais biológicos, como soro, leite e tecidos (WEBER et al., 2013). Quando associada ao sequenciamento, permite a caracterização de cepas, caracterização esta que, se divergente pode resultar em falhas em métodos de diagnóstico e falhas vacinais (WEBER et al., 2014a).

## **2.6 Controle e prevenção**

O controle com vacinação é indicado para rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica ou reprodutiva e com confirmação da presença do BVDV (FLORES, 2012). Sua utilização é recomendada principalmente para a imunização de fêmeas suscetíveis antes da temporada de cobertura, prevenindo a transmissão via transplacentária e consequente geração de animais PI (MOENNIG et al., 2005). A estratégia tem sido bastante utilizada nos Estados Unidos e Canadá, especialmente através do uso de vacinas vivas modificadas (MLV) (NEWCOMER, 2015). Cabe ressaltar que neste tipo de protocolo, há a necessidade de constante atualização acerca das variantes virais em circulação, que devem constar nas vacinas (MAHONY et al., 2005), visto às diferenças de imunidade cruzada entre diferentes espécies e subtipos de pestivírus (RIDPATH, 2016). Isto pode ser exemplificado pela seleção de BVDV-1b em relação à BVDV-1a, através do uso de MLV contendo BVDV-1a no rebanho bovino americanos nos últimos 25 anos (RIDPATH et al., 2011).

No Brasil, predominam as vacinas inativadas contendo BVDV-1a e BVDV-2a, havendo somente uma vacina viva disponível, sendo que todas estas são compostas de espécies que não as de maior ocorrência no país. (de BRITO et al., 2010; Zardo et al., 2017; WEBER et al., 2014). Muitas dessas vacinas são polivalentes e contém também antígenos do herpesvírus bovino tipo 1, vírus respiratório sincicial bovino e vírus parainfluenza bovino tipo 3, além de alguns sorovares de bactérias. Seu uso ainda é incipiente e realizado de forma desigual em diferentes regiões e sistemas de produção (FLORES et al., 2005). Além disso, trabalhos realizados com as vacinas a disposição no País têm demonstrado pouca eficiência destas frente a isolados brasileiros, além da verificação da produção de baixos títulos de anticorpos e ausência de proteção fetal (ZARDO, 2017; ANZILIERO et al., 2015). Diante disso, as vacinas em utilização no Brasil necessitam ser revisadas, devendo conter as espécies em circulação no País.

Em seu trabalho, Silveira et al. (2017) encontraram somente a presença de BVDV-3 no Nordeste brasileiro, através de técnicas moleculares convencionais. Para tanto, buscamos conhecer a epidemiologia dos pestivírus no Nordeste brasileiro através da análise sorológica de amostras, bem como a análise molecular em tempo real.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras

Durante os anos de 2012 e 2013, foram coletadas 19.344 amostras de soro de bovinos, sendo 11.315 de 394 propriedades do estado do Maranhão e 8.029 amostras de 371 propriedades do estado do Rio Grande do Norte. (Figura 6). Estas amostras foram coletadas durante o Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), realizado pelos órgãos oficiais de cada estado para monitorar a circulação viral nesta região. Do total de amostras, foi calculada uma amostragem de 377 soros para estimar a frequência de BVDV na subpopulação deste universo amostral, conforme a fórmula abaixo:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 * p * (1 - p)}{\varepsilon^2}$$

onde  $p$  é a prevalência estimada (50%),  $Z_{(\alpha/2)}$  é o valor da distribuição normal padrão para o nível de confiança estipulado e  $\varepsilon$  é o erro absoluto desejado. O valor foi extrapolado para 600, dessa forma, as 600 amostras foram selecionadas aleatoriamente, através de sorteio realizado no software Excel, para os testes sorológicos individuais e testes moleculares. Cabe ressaltar que as amostras utilizadas neste trabalho são uma subamostragem das amostras analisadas por Silveira et al. (2017), cujo trabalho buscou, através de método molecular convencional, verificar a presença de Pestivírus A, B e H na região Nordeste do Brasil.



Figura 6: Mapa do Brasil indicandoos estados do Maranhão e Rio Grande do Norte com uma estrela preta. (Fonte: Google Maps)

#### 3.2. Cultivo celular e ensaios de vírus-neutralização (VN)

Os isolados de pestivírus utilizados no ensaio de VN incluíram as cepas citopáticas (cp) de BVDV-1a (Oregon C24V), BVDV-2a (VS-253) e BVDV-3 (Italy 83/10), que de agora em diante serão denominadas de BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3, respectivamente. Os isolados de BVDV foram propagados em células de linhagem de rim bovino Madin-Darby (Madin Darby Bovine Kidney, MDBK). Células MDBK usadas durante o estudo foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com antibióticos em uma concentração final de 100 u/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e 5% de soro equino. As células MDBK foram previamente testadas livres para RNA de pestivírus por RT-PCR (WEBER et al., 2014).

As 600 amostras de soro foram incubadas a 56°C em banho-maria por 30 minutos para inativação do sistema complemento. Foi realizada uma triagem conforme descrito no Manual de Padrões para Testes de Diagnóstico e Vacinas da OIE (OIE, 2008). As amostras foram inicialmente testadas em duplicata na diluição 1:10 e 1:20. Amostras positivas na diluição 1:10 foram novamente testadas usando diluições duplo seriadas de 1:4 até 1:512. Um total de 100 TCID<sub>50</sub> (REED e MUENCH, 1938) de vírus foi adicionado a cada poço contendo o soro diluído. As placas contendo as diluições de soro e vírus foram incubadas durante 60 min a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> para a formação do complexo antígeno-anticorpo, nos soros em que os anticorpos estavam presentes. Após a incubação, 50 µL/poço de suspensão de células MDBK, contendo 10<sup>5</sup> células/mL, foram adicionados em todos os poços. As placas foram incubadas por mais 96 h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>, sendo observadas ao final deste período para presença de efeito citopático. As amostras que neutralizaram o vírus a uma diluição de 1:512 foram então testadas em diluições de 1:1.024 a 1:131.072. As placas foram observadas usando um microscópio óptico, em busca de efeito citopático característico. O título de anticorpos foi expresso como o valor recíproco da diluição máxima da amostra na qual foi observado ausência de efeito citopático.

### **3.3. Isolamento de RNA e RT-qPCR**

As 600 amostras foram analisadas em pools de 10 amostras, onde o pool positivo teve suas amostras reanalisadas individualmente. O RNA total foi isolado usando o TRIzol LS Reagent® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A RT-qPCR foi realizada utilizando o kit comercial VetMAX™-Gold BVDV PI Detection Kit (Life Technologies), também conforme instruções do fabricante. Na técnica de RT-qPCR, obteve-se uma amostra positiva, denominada 282.

### **3.4. Sequenciamento e análise filogenética**

A amostra 282, positiva na RT-qPCR, foi submetida à sequenciamento para confirmação de sua identidade. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit GoScript™ (Promega, Madison, WI, EUA) com iniciadores randômicos e a PCR foi realizada utilizando a enzima GoTaq™ (Promega) com os iniciadores SF3/SF3 (LIU, 2009), que amplificam um fragmento de 360 pb da região E2 de BVDV-3. A purificação foi realizada utilizando

PureLink™ PCR Purification Kit (Life Technologies). O sequenciamento foi realizado em um ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer utilizando o kit de sequenciamento do ciclo Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA).

A sequência obtida foi montada no software Geneious versão 9.0.5 e teve sua identidade confirmada utilizando a ferramenta BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)). A árvore filogenética foi construída utilizando o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2011) com o modelo de inferência *Maximum Likelihood* (ML), modelo de substituição GTR+G+I em 1000 réplicas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Vírus-neutralização

No presente trabalho, 600 amostras de soro bovino foram testadas através de VN contra as cepas das espécies de BVDV-1, -2 e -3. Os resultados obtidos demonstram que 156 amostras (26%) são soropositivas, sendo possível determinar para quais espécies as amostras possuem anticorpos em 24,5% (147/600) destas. Desse total, 14,3% (86/600) são soropositivas para o BVDV-2, 5,3% (32/600) para o BVDV-1 e 3,3% (20/600) para o BVDV-3. Em 9/600 (1,5%) das amostras não foi possível determinar para qual espécie a amostra é soropositiva, tendo sido obtidos os valores de 0,7% (4/600) com anticorpos contra o BVDV1 e BVDV-2, 0,5% (3/600) contra o BVDV-1 e BVDV-3 e 0,3% (2/600) contra o BVDV-2 e BVDV-3. Os títulos podem ser visualizados na Tabela 2. Na Figura 7 podem ser observados os valores de amostras soropositivas por espécie viral.

Tabela 2: Títulos de anticorpos neutralizantes determinados na vírus-neutralização contra cepas de BVDV-1, -2 e -3 em soro de bovinos testados no presente estudo.

ID	Propriedade	Propriedade	Estado	Município	Idade	Oregon C24V	VS-253	Italy 83/10
509	P1	Assent. Ronaldo Valença	RN	Augusto Severo	0	64	<8	<8
522	P2	Assent. São José	RN	Caraúbas	0	8	<8	<8
512	P3	Berrador	MA	Coroatá	22	8	<8	<8
517	P3	Berrador	MA	Coroatá	18	16	<8	<8
521	P3	Berrador	MA	Coroatá	13	32	128*	<8
216	P4	Caturure	RN	Jardim do Seridó	9	<8	256	<8
223	P4	Caturure	RN	Jardim do Seridó	14	<8	128	<8
227	P4	Caturure	RN	Jardim do Seridó	17	<8	1024	<8
180	P5	Faz. Almeida Sá	MA	Jenipapo dos Vieiras	14	<8	16	<8
326	P6	Faz. Alvorada I	MA	Barra do Corda	18	<8	4	<8
327	P6	Faz. Alvorada I	MA	Barra do Corda	18	<8	128	<8
331	P6	Faz. Alvorada I	MA	Barra do Corda	23	<8	256	<8
353	P6	Faz. Alvorada I	MA	Barra do Corda	22	<8	256	<8
500	P7	Faz. Baluarte	RN	Caraúbas	0	64	256*	<8
502	P7	Faz. Baluarte	RN	Caraúbas	0	32	256*	<8
520	P7	Faz. Baluarte	RN	Caraúbas	0	32	<8	<8
116	P8	Faz. Barro Vermelho	RN	Nova Cruz	9	16	<8	<8
120	P8	Faz. Barro Vermelho	RN	Nova Cruz	8	128	<8	512

368	P8	Faz. Barro Vermelho	RN	Nova Cruz	10	8	<8	<8
371	P8	Faz. Barro Vermelho	RN	Nova Cruz	9	128	<8	<8
108	P9	Faz. Bela Vista	MA	Açailândia	10	<8	512	<8
461	P9	Faz. Bela Vista	RN	Santa Cruz	0	<8	128	<8
205	P10	Faz. Boa Esperança	MA	Mirador	8	<8	128	<8
416	P10	Faz. Boa Esperança	MA	Açailândia	12	<8	128	<8
420	P10	Faz. Boa Esperança	MA	Açailândia	17	<8	256	<8
433	P10	Faz. Boa Esperança	MA	Açailândia	10	<8	64	<8
567	P10	Faz. Boa Esperança	MA	Bacabal	12	32	64	<8
577	P10	Faz. Boa Esperança	MA	Bacabal	16	128	<8	<8
599	P10	Faz. Boa Esperança	MA	Bacabal	24	128	<8	<8
91	P11	Faz. Boa Sorte	MA	Bom Jesus das Selvas	14	<8	128	64
96	P12	Faz. Bola Verde	MA	Vila Nova dos Martírios	12	16	<8	<8
516	P13	Faz. Cacimba	RN	Augusto Severo	0	256	<8	<8
556	P14	Faz. Canta Galo	MA	São Raimundo das Mangabeiras	17	32	256*	<8
560	P14	Faz. Canta Galo	MA	São Raimundo das Mangabeiras	8	64	256*	<8
483	P15	Faz. Centro do Ribeiro III	MA	Zé Doca	9	64	32	<8
491	P15	Faz. Centro do Ribeiro III	MA	Zé Doca	7	32	<8	<8
450	P16	Faz. Cisne Branco	MA	Buritirana	18	<8	256*	32
452	P16	Faz. Cisne Branco	MA	Buritirana	14	<8	2048	<8
215	P17	Faz. Conceição	RN	São Pedro	7	<8	512	<8
217	P17	Faz. Conceição	RN	São Pedro	7	128	<8	<8
474	P18	Faz. Coroa	MA	São Pedro dos Crentes	20	<8	512	<8
403	P19	Faz. Cotovelo	MA	Bom Jardim	12	<8	1024*	256
426	P20	Faz. Country Sul	MA	Arame	14	<8	32	<8
93	P21	Faz. Cruzeiro do Norte	MA	Açailândia	13	32	2048*	<8
499	P22	Faz. Dallas	MA	Centro Novo do Maranhão	11	64	512*	<8
501	P22	Faz. Dallas	MA	Centro Novo do Maranhão	10	16	<8	<8
503	P22	Faz. Dallas	MA	Centro Novo do Maranhão	23	32	<8	<8
515	P22	Faz. Dallas	MA	Centro Novo do Maranhão	13	64	<8	<8
494	P23	Faz. Diamantina	MA	Presidente Dutra	13	16	<8	<8
495	P23	Faz. Diamantina	MA	Presidente Dutra	12	32	<8	<8
115	P23	Faz. Dinamarca	RN	Mossoró	18	16	256*	64
293	P24	Faz. do Cajueiro	MA	Altamira do Maranhão	16	<8	16	<8

408	P25	Faz. Esmeralda 3	MA	Bom Jardim	12	<8	128	<8
550	P25	Faz. Esmeralda 3	MA	Bom Jardim	12	64	<8	<8
497	P26	Faz. Estrela	MA	Centro Novo do Maranhão	13	32	<8	<8
498	P26	Faz. Estrela	MA	Centro Novo do Maranhão	12	32	256*	<8
82	P27	Faz. Furna Azul	MA	Vila Nova dos Martírios	13	<8	<8	32
84	P27	Faz. Furna Azul	MA	Vila Nova dos Martírios	12	<8	<8	32
85	P27	Faz. Furna Azul	MA	Vila Nova dos Martírios	9	<8	64*	16
98	P27	Faz. Furna Azul	MA	Vila Nova dos Martírios	14	8	<8	<8
101	P27	Faz. Furna Azul	MA	Vila Nova dos Martírios	8	<8	<8	64
103	P27	Faz. Furna Azul	MA	Vila Nova dos Martírios	15	32	<8	<8
203	P28	Faz. Gravata	RN	São Pedro	7	<8	2048	<8
549	P29	Faz. Imperial	MA	São Raimundo do Doca Bezerra	14	32	<8	<8
250	P30	Faz. Independência	MA	Peritoró	14	32	<8	32
253	P30	Faz. Independência	MA	Peritoró	18	<8	16	<8
48	P31	Faz. Japi	RN	Japi	23	<8	128*	16
527	P32	Faz. Lago Verde	MA	São Mateus do Maranhão	14	<8	16	<8
525	P33	Faz. Leocadio	MA	São Domingos do Maranhão	8	<8	16	<8
545	P33	Faz. Leocadio	MA	São Domingos do Maranhão	18	128	256	<8
552	P33	Faz. Leocadio	MA	São Domingos do Maranhão	12	128	<8	<8
455	P34	Faz. Marvil	MA	Buritirana	14	<8	256	<8
459	P34	Faz. Marvil	MA	Buritirana	12	<8	128	<8
466	P34	Faz. Marvil	MA	Buritirana	12	<8	512	<8
97	P35	Faz. Melancia	MA	Nova Colinas	16	16	<8	<8
99	P35	Faz. Melancia	MA	Nova Colinas	15	8	<8	<8
65	P36	Faz. Morrinhos	MA	Açailândia	7	<8	<8	8
16	P37	Faz. Morro Bonito	MA	Amarante do Maranhão	18	<8	2048	<8
344	P38	Faz. Muquem	MA	Itinga do Maranhão	16	<8	256	<8
354	P39	Faz. N. Sra. de Fátima	MA	Tuntum	10	4	<8	<8
373	P39	Faz. N <sup>a</sup> . Sra. de Fátima	MA	Tuntum	10	32	<8	<8
55	P40	Faz. N <sup>a</sup> . Sra. de Fátima II	MA	Amarante do Maranhão	16	<8	<8	128
61	P40	Faz. N <sup>a</sup> . Sra. de Fátima II	MA	Amarante do Maranhão	18	<8	<8	8
553	P41	Faz. Nativa	MA	Bom Jardim	18	32	256*	<8
558	P41	Faz. Nativa	MA	Bom Jardim	18	16	256*	<8
594	P41	Faz. Nativa	MA	Bom Jardim	18	32	256*	<8
346	P42	Faz. Nova	RN	Nova Cruz	0	<8	256	<8

350	P42	Faz. Nova	RN	Nova Cruz	0	<8	512	<8
264	P43	Faz. Nova Califórnia	RN	Mossoró	21	<8	<8	32
488	P44	Faz. Nova Esperança	MA	Poção de Pedras	14	8	128*	<8
328	P45	Faz. Olho D'água	MA	Barra do Corda	23	<8	64	<8
244	P46	Faz. Oliveira	MA	Pindaré-Mirim	18	32	<8	64
252	P46	Faz. Oliveira	MA	Pindaré-Mirim	16	<8	<8	32
523	P47	Faz. Palmeira I e II	MA	Amarante do Maranhão	18	8	128*	<8
530	P47	Faz. Palmeira I e II	MA	Amarante do Maranhão	17	32	512*	<8
531	P47	Faz. Palmeira I e II	MA	Amarante do Maranhão	19	8	128	<8
533	P47	Faz. Palmeira I e II	MA	Amarante do Maranhão	16	32	128*	<8
534	P47	Faz. Palmeira I e II	MA	Amarante do Maranhão	19	64	2048	<8
537	P47	Faz. Palmeira I e II	MA	Amarante do Maranhão	18	32	512*	<8
41	P48	Faz. Pantanal	MA	Alto Alegre do Pindaré	17	<8	256	<8
63	P49	Faz. Paraíso	MA	Açailândia	7	<8	<8	16
77	P49	Faz. Paraíso	MA	Açailândia	8	<8	64	64
191	P50	Faz. Ponta Grossa	RN	Extremoz	13	<8	128	<8
208	P50	Faz. Ponta Grossa	RN	Extremoz	10	8	64*	<8
597	P50	Faz. Ponta Grossa	RN	Extremoz	8	64	<8	<8
231	P51	Faz. Ramada	RN	Carnaúba dos Dantas	17	<8	512	<8
54	P52	Faz. Rancho Rico	MA	Arame	10	<8	<8	16
135	P53	Faz. Reinar Agropecuária	MA	Amarante do Maranhão	14	16	<8	<8
460	P54	Faz. Rio Branco	MA	Presidente Médici	7	<8	256	<8
248	P55	Faz. Rio Largo	MA	Caxias	18	<8	256*	16
570	P56	Faz. Rodominas	MA	Bom Jesus das Selvas	18	<8	256	<8
70	P57	Faz. Santa Júlia	MA	Bom Jardim	14	<8	<8	128
95	P58	Faz. Santa Luzia	MA	Bom Jesus das Selvas	18	<8	128	<8
316	P59	Faz. Santa Rita	MA	Açailândia	8	<8	8	<8
69	P60	Faz. Santos Dumont	MA	Açailândia	14	<8	512	64
92	P61	Faz. São João	MA	Fortaleza dos Nogueiras	13	64	2048*	<8
102	P61	Faz. São João	MA	Fortaleza dos Nogueiras	14	16	<8	<8
182	P61	Faz. São João	MA	Fortaleza dos Nogueiras	11	32	1024*	<8
387	P61	Faz. São João	RN	Campo Redondo	0	<8	<8	64
57	P62	Faz. São José	MA	Bom Jardim	14	<8	<8	32
58	P62	Faz. São José	MA	Bom Jardim	12	<8	<8	32
59	P62	Faz. São José	MA	Bom Jardim	14	<8	<8	16

62	P62	Faz. São José	MA	Bom Jardim	14	<8	<8	16
64	P62	Faz. São José	MA	Bom Jardim	14	<8	<8	32
78	P62	Faz. São José	MA	Bom Jardim	14	<8	<8	16
34	P63	Faz. São Manoel	MA	Altamira do Maranhão	17	<8	256	<8
526	P64	Faz. Sapo Afogado	MA	Amapá do Maranhão	17	16	64*	<8
247	P65	Faz. Taiga	MA	Centro do Guilherme	20	8	<8	64
222	P66	Faz. Três Corações	RN	Jardim do Seridó	13	<8	64	<8
138	P67	Faz. Vale Verde	MA	Buriticupu	18	<8	2048	<8
425	P68	Faz. Vieira	MA	Centro Novo do Maranhão	14	<8	256	<8
447	P68	Faz. Vieira	MA	Centro Novo do Maranhão	14	<8	64	<8
376	P69	Faz. Vitória	MA	Sítio Novo	9	64	<8	<8
228	P70	Jenipapo	MA	Paraibano	13	<8	512	<8
49	P71	Lageadinho	MA	São João do Paraíso	12	<8	<8	16
585	P72	Não informado	NI	Não informado	0	64	<8	<8
592	P72	Não informado	NI	Não informado	0	32	<8	<8
213	P72	Não informado	NI	Não informado	0	128	128	<8
242	P73	Não informado	MA	Central do Maranhão	16	<8	<8	128
243	P73	Não informado	MA	Central do Maranhão	14	128	<8	128
249	P73	Não informado	MA	Central do Maranhão	16	16	<8	<8
589	P75	P.A Santa Clara II	RN	Cerro Corá	0	32	<8	<8
171	P76	São Pedro	MA	Viana	20	<8	64	<8
395	P77	Sítio Bela Fonte	RN	Apodi	14	<8	512	<8
207	P78	Sítio Gavião	RN	Caicó	7	<8	64	<8
338	P78	Sítio Gavião	RN	Caicó	12	<8	32	<8
363	P79	Sítio Laginhas	RN	Caicó	11	4	<8	<8
598	P80	Sítio Malhada da Areia	RN	Currais Novos	9	8	<8	<8
176	P81	Sítio Mineiro	RN	São Fernando	12	<8	128	<8
197	P82	Sítio Santa Tereza	RN	Pau dos Ferros	15	<8	2048*	16
379	P83	Sítio Santo Alberto	RN	Coronel Ezequiel	14	128	<8	<8
195	P84	Sítio Soledade	RN	Jucurutu	8	<8	32	<8
202	P84	Sítio Soledade	RN	Jucurutu	8	<8	16	<8
211	P84	Sítio Soledade	RN	Jucurutu	8	<8	64	<8
214	P84	Sítio Soledade	RN	Jucurutu	8	<8	32	<8
179	P85	Sítio Trapiá	RN	Caicó	18	<8	1024	<8
199	P85	Sítio Trapiá	RN	Caicó	18	<8	128	<8
46	P86	Sítio Tres Riachos	RN	Jardim de Piranhas	14	<8	512	<8
470	P87	Sítio Veneza	RN	Ipanguaçu	0	<8	64	<8



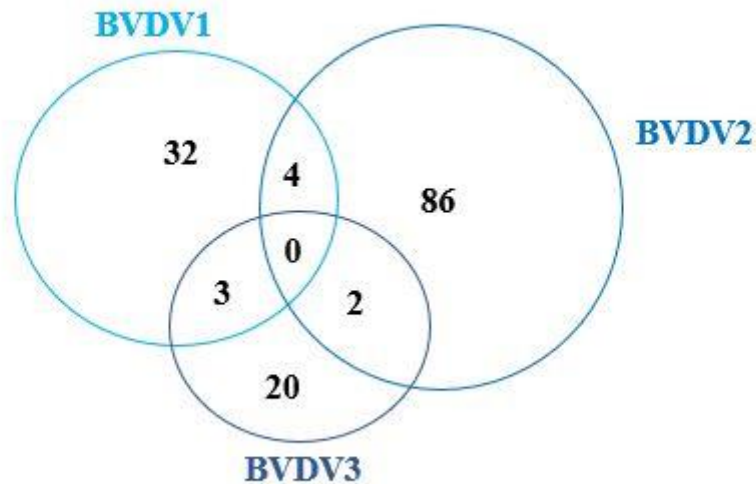


Figura 7: Diagrama de Venn com os resultados da VN representando a proporção de amostras positivas contra cada espécie viral.

#### 4.2. RT-qPCR, sequenciamento e análise filogenética

Para verificação da presença de genoma viral de pestivírus, as amostras foram submetidas a RT-qPCR. Uma das 600 amostras resultou positiva (0,16%). Essa amostra, nomeada 282, teve uma porção da região E2 amplificada (LIU, 2009), submetida a sequenciamento e analisada. Utilizando o programa BLASTn, a amostra apresentou identidade de 97,6% com o identificado na amostra LV81-67/16MA (Número de acesso do GenBank KY864956.1) detectada no Brasil em 2017 (SILVEIRA et al., 2017) e suportada por um valor de bootstrap de 88%. Na análise filogenética, são observados três grupos que representam as espécies de pestivírus BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3 (Figura 8) suportados por valores de réplicas de 100%.

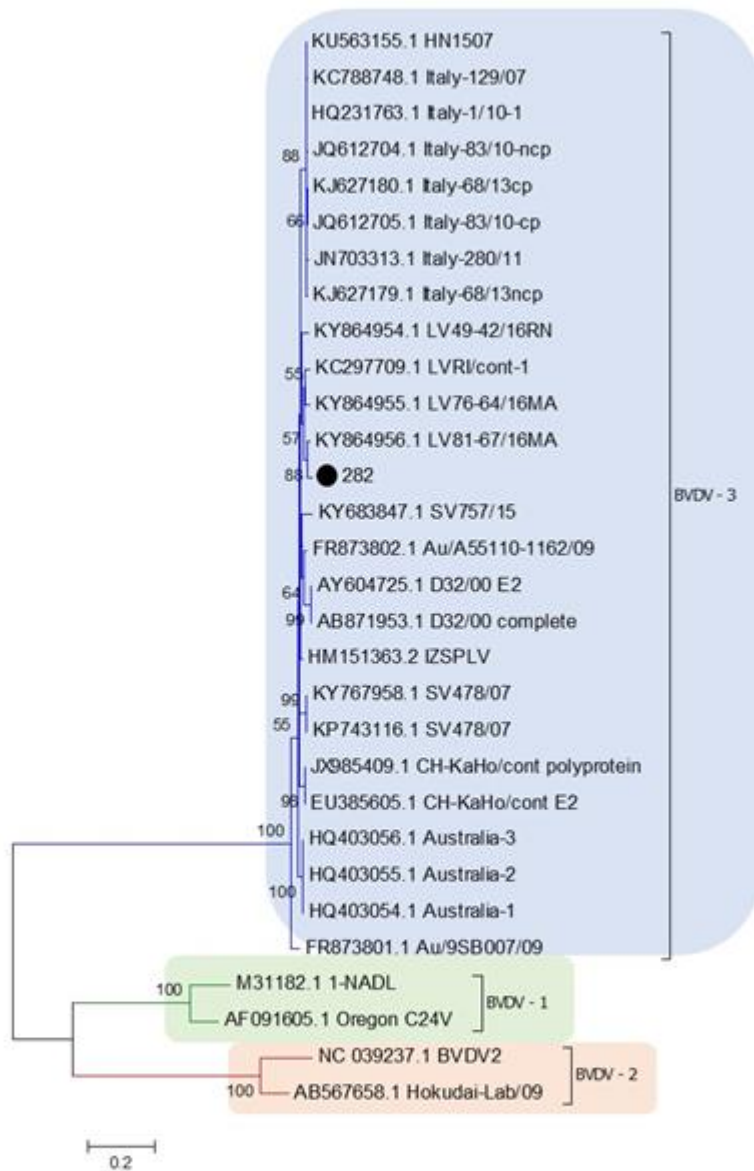


Figura 8: Árvore filogenética baseada na região do gene da proteína E2 das seqüências das espécies de pestivírus BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3.

## 5. DISCUSSÃO

O BVDV é um importante patógeno viral de ruminantes em todo o mundo e pode causar perdas econômicas severas (NEILL, 2013), como a redução do desempenho reprodutivo, além da redução da produtividade, diminuindo o ganho de peso e aumentando o tempo para abate e produção de leite (HOUE, 2003; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Para que a competitividade brasileira na produção de carne bovina seja mantida, assegurar a sanidade dos rebanhos é imprescindível, tornando, assim, necessária a realização de programas de controle e prevenção da doença (HOUE, 2003) Contudo, isto só é possível quando existem informações adequadas sobre a sua epidemiologia, além de uma estrutura eficiente para o diagnóstico. Assim, o conhecimento das variantes virais em determinada região é importante para o estabelecimento de métodos de diagnóstico e de controle adequados, haja vista que há relatos de falhas de protocolos comumente utilizados em casos de novas variantes virais (FULTON, 2015; PELETTI et al., 2012; WEBER et al., 2016b) e baixa reatividade cruzada entre espécies e subtipos virais (PIZARRO-LUCERO et al., 2006; BACHOFEN et al., 2008; NAGAI et al., 2008; RIDPATH et al., 2010; BIANCHI et al., 2011; BAUERMAN; FLORES; RIDPATH, 2012; BAUERMAN; FALKENBERG; RIDPATH, 2016).

No presente estudo, 26,2% das amostras apresentaram anticorpos contra, pelo menos, uma das espécies de BVDV. Há de se observar que a ocorrência de anticorpos neutralizantes para o BVDV-1 e -2 podem ser oriundos de vacinação, dados estes indisponíveis sobre os rebanhos analisados. Em um trabalho realizado em 2010 com 784 amostras de soro bovino coletadas em diferentes municípios de Minas Gerais e São Paulo utilizando a VN contra as cepas Singer e SV-253 (BVDV-1 e BVDV-2, respectivamente), Dias et al. observaram 62,8% de soroprevalência contra o BVDV. Valores similares a este foram encontrados em outro trabalho, realizado paralelamente ao Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBTA) no estado de Goiás, durante o qual as amostras foram coletadas. Neste trabalho, os autores encontraram uma soroprevalência de 64% (IC 95% 62,4 – 65,6) em uma população de fêmeas bovinas com mais de 24 meses (n = 3.533), e 60,1% em uma população de fêmeas bovinas na faixa etária de 6 a 24 meses (n = 872), também pela técnica de VN, contra a cepa Singer (BVDV-1) (de BRITO et al., 2010). Cabe destacar que todos os indivíduos amostrados no presente estudo possuíam até 24 meses, o que contribui para a baixa prevalência em relação ao estudo goiano, além do número de amostras testadas, que foi consideravelmente menor. Assim, animais com mais de 24 meses, teriam mais oportunidades para possíveis infecções, o que aumentaria a prevalência no grupo amostrado. Na Malásia, Daves et al., 2016, encontraram 33,2% de soropositividade com um ensaio de ELISA com 407 indivíduos, sendo que 36,7% dos animais positivos eram adultos, e 15,2% animais jovens, o que corrobora a hipótese de que os animais testados no presente estudo, sendo jovens, apresentam um percentual de soropositividade baixo em relação ao que seria esperado com animais com mais de 24 meses, pois podem ainda carrear anticorpos neutralizantes oriundos da amamentação.

Em contraste aos altos valores de prevalência mencionados, o estudo recente de Zardo et al. (2017), encontrou uma soroprevalência de 11,2% em teste de VN utilizando a cepa NADL (BVDV-1) em 258 bovinos de criações mistas no município de Novo Xingu, no

noroeste do Rio Grande do Sul, havendo que ser observado novamente o número amostral baixo, assim como a prevalência observada. Em comparação com os valores destes outros trabalhos que também utilizaram VN, com o percentual de soropositivos obtido com o número de amostras no presente estudo, pode-se hipotetizar que, caso o total de indivíduos dos Estados fosse analisado, a prevalência observada seria maior.

Em relação ao relatado em outros países, na Hungria, Szabára et al. (2016), realizaram um estudo sobre a prevalência entre os anos de 2008 a 2012 com cerca de 75% da população bovina do país, e demonstraram que a prevalência do BVDV foi de 12,4%. Para este trabalho, foi utilizado um kit comercial de ELISA. Diante da abrangência do estudo neste país, a prevalência encontrada é bastante baixa. Já Lanyon e colaboradores apontam uma prevalência de 80% dos rebanhos australianos, em estudo realizado para moldar um programa de controle e erradicação da doença no país. Em diversos países da Europa, nos quais foram utilizadas diferentes metodologias para análise (VN, ELISA direto e indireto) os valores variam de 58 a 90% de soropositividade (DINHEIRO RURAL, 2019). No continente asiático, em Bangladesh, Uddin et al. (2017) encontraram o percentual de 51,1% utilizando um kit de ELISA indireto. Na Tailândia, Kampa et al., 2004 encontraram valores de 73% com um teste de ELISA indireto com leite de tanques com 11 rebanhos leiteiros, sendo que na análise dos rebanhos individualmente, entre os animais jovens, o percentual foi de 15% de prevalência, somente. Mahmoud, et al., 2013 encontraram 26% de soroprevalência em 460 soros bovinos restados por teste de ELISA comercial, na Arábia Saudita. Kalungara et al., na Índia em 2015 encontraram 24,7% de soropositividade em 385 bovinos leiteiros. Lanyon e colaboradores apontam uma prevalência de 80% dos rebanhos australianos, em estudo realizado para moldar um programa de controle e erradicação da doença no país.

No presente trabalho, foram testadas amostras de soro de bovinos por VN onde a soroprevalência foi maior contra BVDV-2 em relação a BVDV-1 e -3. A maior soroprevalência contra BVDV-2 observada difere de outros trabalhos realizados em bovinos no restante do mundo, onde geralmente o BVDV-1 é mais frequente do que as outras espécies de pestivírus de ruminantes (RIDPATH et al., 2010). Além disso, os dados aqui gerados contrastam com trabalho realizado na mesma região do estudo utilizando RT-PCR seguida de sequenciamento, onde o BVDV-3 foi a única espécie detectada através de métodos moleculares (SILVEIRA et al., 2017).

Cabe ressaltar o fato de que a proporção de espécies de pestivírus bovino varia de acordo com a região geográfica (ABE et al., 2016; BOOTH et al., 2013; GIAMMARIOLI et al., 2015; MAYA et al., 2016; WEBER et al., 2014; WORKMAN et al., 2016) e a aplicação de VN contra espécies diferentes de pestivírus permite uma melhor interpretação das espécies virais que circulam na região. Há ainda que se observar que a grande parte dos trabalhos que realizam testes de VN para o BVDV utilizam apenas cepas do BVDV-1 que, na sua maioria, são cepas de referência do vírus, as quais favorecem a leitura e interpretação dos resultados em razão da característica de alta citopatogenicidade além de ser a espécie mais relatada no mundo (SANDVICK, 2005). Todavia, estudos já demonstraram as divergências existentes entre os resultados dos testes de VN contra o BVDV-1 e o BVDV-2, bem como seus respectivos títulos de anticorpos, em bovinos vacinados ou experimentalmente infectados (RIDPATH et al., 2010; BIANCHI et al., 2011; BAUERMANN et al., 2012; BAUERMANN et al., 2016). Diante disso, a

utilização de diferentes cepas de BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3, como realizado neste trabalho, se fazem necessárias nestes testes para que os dados obtidos sejam confiáveis e mostrem a real ocorrência do BVDV em cada região estudada. Em estudos realizados em outras regiões do País, Dias et al. (2010) aponta maior soroprevalência de BVDV-1 em relação a BVDV-2 nos estados de Minas Gerais e São Paulo, enquanto Flores et al. (2000) encontrou soroprevalência similar entre BVDV-1 e -2 no Rio Grande do Sul.

Em relação aos dados moleculares obtidos, uma única amostra foi positiva e classificada como BVDV-3, através de sequenciamento. Cabe ressaltar que as amostras utilizadas neste trabalho são uma parcela das amostras analisadas por Silveira et al. (2017), que em seu trabalho detectou através de técnicas moleculares convencionais (RT-PCR) 17 amostras positivas para BVDV-3, sendo nenhuma amostra positiva para BVDV-1 ou BVDV-2. Observando-se estes dados, em comparação à maior soroprevalência para BVDV-2 observada no presente estudo, demandam testes adicionais para a investigação destas incongruências entre os resultados observados, como a análise acerca da possível vacinação destes rebanhos e caso tenha havido alguma vacinação, quais as espécies estavam contempladas nas vacinas utilizadas – haja vista que o maior número de amostras apresentou anticorpos para a cepa VS-253, que não está incluída em nenhuma vacina comercial disponível no país.

Estes dados sugerem que mesmo dentro do Brasil a predominância de uma espécie de pestivírus em relação a outra varia, e estes resultados devem ser levados em consideração na aplicação de protocolos vacinais contra a BVD. Atualmente no mercado brasileiro existem vacinas contendo cepas do BVDV em conjunto com outros vírus e bactérias. É importante destacar que as cepas utilizadas nestas vacinas não são as espécies que mais circulam no país. Diante desse fato, pesquisas como a do presente trabalho são necessárias para que as vacinas oferecidas sejam atualizadas para as espécies de pestivírus existentes nos rebanhos brasileiros, proporcionando uma proteção efetiva.

## **6. CONCLUSÃO**

Diante dos dados apresentados, conclui-se que anticorpos neutralizantes contra todos os três pestivirus analisados estavam presentes em bovinos da Região Nordeste, destacando-se a maior ocorrência de anticorpos contra o BVDV-2. A maior soroprevalência para BVDV-2 observada no presente estudo contrasta com a maior frequência de BVDV-1 relatada na maior parte do mundo, além da maior frequência de BVDV-3 relatada na mesma região em trabalho prévio utilizando RT-PCR e sequenciamento. Os dados expostos no presente estudo reforçam a necessidade de revisão das vacinas contra a BVD utilizadas nesta região que devem conter as espécies circulantes de BVDV-1, -2 e -3.

## REFERÊNCIAS

- ABE, Y., T. TAMURA, S. TORII, S. WAKAMORI, M. NAGAI, K. MITSUHASHI, J. MINE, Y. FUJIMOTO, N. NAGASHIMA, F. YOSHINO, Y. SUGITA, T. NOMURA, M. OKAMATSU, H. KIDA, Y. SAKODA. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2016.
- ADLER, H.; FRECH, B.; MEIER, P.; JUNGI, T. W.; PETERHANS, E. Noncytopathic strains of bovine viral diarrhoea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, United States, 1994.
- ANZILIERO, D., et al. Resposta sorológica aos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Ciência Rural*, 2015.
- AVALOS-RAMIREZ, R.; ORLICH, M.; THIEL, H. J.; BECHER, P. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, 2001.
- BACHOFEN, C.; STALDER, H.; BRAUN, U. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Veterinary Microbiology*, 2008.
- 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*, 2008.
- BAKER J.C. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 1987.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1995.
- BAUERMANN, F. V.; FALKENBERG, S. M.; RIDPATH, J. F. HoBi-like virus RNA detected in foetuses following challenge of pregnant cows that had previously given birth to calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016.
- BAUERMANN, F. V.; FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F. Antigenic relationships between bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012.
- BAUERMANN, F.; FALKENBERG, S.; RIDPATH, J. HoBi-like virus RNA detected in foetuses following challenge of pregnant cows that had previously given birth to calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Transboundary Emerging Diseases*, 2016.
- BECHER, P., ORLICH, M., KOSMIDOU, A., KONIG, M., BAROTH, M., THIEL, H-J. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 1999.

BECHER, P.; TAUTZ, N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biology*, 2011.

BECHER, P.; AVALOS-RAMIREZ, R.; ORLICH, M.; CEDILLO-ROSALES, S.; KÖNIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMAYER, H.; THIEL, H. J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 2003.

BEER, M.; WERNIKE, K.; DRÄGER, C.; HÖPER, D.; POHLMANN, A.; BERGERMANN, C.; SCHRÖDER, C.; KLINKHAMMER, S. BLOME, S.; HOFFMANN, B. High Prevalence of Highly Variable Atypical Porcine Pestiviruses Found in Germany. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016.

BIANCHI, E.; MARTINS, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2011.

BIELEFELDT OHMANN, H. In situ characterization of mononuclear leukocytes in skin and digestive tract of persistently bovine viral diarrhea virus-infected clinically healthy calves and calves with mucosal disease. *Veterinary Pathology*, United States, 1988.

BIELEFELDT OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection: a window on the pathogenesis. *Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice*, United States, 1995.

BIELEFELDT OHMANN, H.; RONSHOLT, L; BLOCH, B. Demonstration of Bovine Viral Diarrhea Virus in Peripheral-Blood Mononuclear-Cells of Persistently Infected, Clinically Normal Cattle. *Journal of General Virology*, 1987.

BOLIN, S. R. Bovine viral diarrhea viruses in mixed infections. In: BROGDEN, K. M.; GUTHMILLER, J. M. *Polymicrobial Diseases*. Washington DC: ASM Press, p. 33-50, 2002.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *American Journal of Veterinary Research*, United States, 1995.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. Prevalence of bovine viral diarrhea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. United States, 1998.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. *American Journal of Veterinary Research*, United States, 1990.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhea virus vaccines. *American Journal of Veterinary Research*, United States, 1989.



BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. The clinical significance of genetic variation among bovine viral diarrhoea viruses. *Veterinary Medicine, United States*, 1996.

BOLIN, S.R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1995.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998.

BOTTON, S. A.; SILVA, A. M.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross neutralization. *Brazilian Journal Medical Biological Research, Brazil*, 1998.

BROCK, K. V. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, United States*, 1995.

BROCK, K. V.; DENG, R.; RIBLET, S. M. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 38, n. 1, p. 39–46, jul. 1992.

BROCK, K. V.; DENG, R.; RIBLET, S. M. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *Journal of Virological Methods*, 1992.

BROWN, F. The development of chemically synthesized vaccines. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. United States*, 1989.

BROWNLIE, J. M.; CLARKE, M. C.; HOWARD, C. J.; POCOCK, D. H. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection in cattle. *Annales de Recherches Vétérinaires, France*, 1987.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, 1990.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M. C.; HOWARD, C. J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Research in Veterinary Science, England*, 1989.

BRUM, M. C. S.; CARON, L.; CHOWDHURY, S. I.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de uma cepa inativada do herpesvírus bovino tipo 5 defectiva na timidina quinase e glicoproteína E. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2010.

CANAL, C. W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology, Netherlands*, 1998.

CHARLESTON, B.; FRAY, M. D.; BAIGENT, S.; CARR, B. V.; MORRISON, W. I. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *Journal of General Virology*, 2001.

CHASE, C. C.; BRAUN, L. J.; LESLIE-STEEN, P.; GRAHAM, T.; MISKIMINS, D.; RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus multiorgan infection in two white-tailed deer in southeastern South Dakota. *Journal of Wildlife Diseases*, United States, 2008.

CHASE, C. C.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, United States, 2004.

CHILDS, T. X. Disease in cattle - Saskatchewan. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Canada, 1946.

COLETT, M. S.; LARSON, R.; GOLD, C.; STRICK, D.; ANDERSON, D. K.; PURCHIO, A. F. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Virology*, 1988.

COOK, L. G.; LITTLEJOHNS, I. R.; JESSEP, T. M. Induced sero-conversion in heifers with a field strain of bovine pestivirus - a comparison of methods and doses. *Australian Veterinary Journal*, Australia, 1990.

CORAPI, W. V.; DONIS, R. O.; DUBOVI, E. J. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *Journal of Virology*, United States, 1988.

CORREA, W. M.; NETTO, Z. C.; BARROS, H. M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 1968.

CORTESE, V. S.; WHITTAKER, R.; ELLIS, J.; RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea. *American Journal of Veterinary Research*, United States, 1998.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; de CASTRO, M. M. G.; SOARES, R. M.; PINTO, A. M. V.; ALFIERI, A. A.; FLORES, E. F.; LEITE, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5' -UTR region 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2006.

COUVREUR, S.; LETELLIER, C.; COLLARD, A.; QUENON, P.; DEHAN, P.; HAMERS, C.; PASTORET, P. P.; KERKHOFS, P. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Research*, Netherlands, 2002.

DAMBRÓS, Fernando. Diarreia Viral Bovina (BVD): Como a Europa está tentando erradicar a doença. *Dinheiro Rural*, 2019. Disponível em: <<https://www.dinheiro rural.com.br/diarreia-viral-bovina-bvd-como-a-europa-esta-tentando-erradicar-a-doenca/>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

DAVES, L.; YIMER, N.; Arshad, S. S.; SARSAIFI, K.; OMAR, M. A.; YUSOFF, R.; HARON, A. W.; ABDULLAH, F. F. J. Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection and Associated Risk Factors in Cattle in Selangor, Malaysia. *Veterinary Medicine Open Journal*, 2016.

de BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 2010.

DECARO, N.; LUCENTE, M. S.; MARI, V.; CIRONE, F.; CORDIOLI, P.; CAMERO, M.; SCIARRETTA, R.; LOSURDO, M.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 2011.

DECARO, N.; MARI, V.; PINTO, P.; LUCENTE, M. S.; SCIARRETTA, R.; CIRONE, F.; COLAIANNI, M. L.; ELIA, G.; THIEL, H. J.; BUONAVOGLIA, C. Hobi-like pestivirus: Both biotypes isolated from a diseased animal. *Journal of General Virology*, 2012a.

DECARO, N.; LUCENTE, M. S.; MARI, V.; SCIARRETTA, R.; PINTO, P.; BUONAVOGLIA, D.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012b.

DENG, R.; BROCK, K. V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Research*, England, 1993.

DENG, Y.; SUN, C. Q.; CAO, S. J.; LIN, T.; YUAN, S. S.; ZHANG, H. B.; ZHAI, S. L.; HUANG, L.; SHAN, T. L.; ZHENG, H.; WEN, X. T.; TONG, G. Z. High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. *Veterinary Microbiology*, 2012.

DIAS, F. C. Vírus da diarréia viral bovina (BVDV): caracterização epidemiológica e molecular nos estados de Minas Gerais e São Paulo, Brasil. 2008. 157 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista — Campus Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.

DIAS, F. C.; ALEXANDRINO, B.; MEDEIROS, A. S. R.; PEREIRA, G. T.; OLIVEIRA, M. C.; SAMARA, S. I. Comparison of virus neutralization tests against genotypes 1 and 2 of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV-1 and BVDV-2) in cattle of naturally infected herds. *Ciência Rural*, 2010.

DONIS, R. O. Bovine viral diarrhoea: the unraveling of a complex of clinical manifestations. *The Bovine Proceedings*, 1989.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. United States, 1995.

DONIS, R. O.; CORAPI, W.; DUBOVI, E. J. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *The Journal of General Virology*. England, 1988.

DONIS, R.; DUBOVI, E. J. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology*, United States, 1987.

DRAGER, C.; BEER, M.; BLOME, S. Porcine complement regulatory protein CD46 and heparan sulfates are the major factors for classical swine fever virus attachment in vitro. *Archives of Virology*, 2015.

DREW, T.W.; YAPP, F.; PATON, D.J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Veterinary Microbiology*, 1999.

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*. United States, 2006.

DUBOVI, E. J. Genetic diversity and BVD virus. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, England, 1992.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 2013.

DUFFELL, S. J.; HARKNESS, J. W. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Veterinary Record*, England, 1985.

EDWARDS, S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. France, 1990.

EDWARDS, S.; PATON, D. Antigenic differences among pestiviruses. *Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice*, United States, 1995.

FERNÁNDEZ-SAINZ, I. J.; LARGO, E.; GLADUE, D. P.; FLETCHER, P.; O'DONNELL, V.; HOLINKA, L. G.; CAREY, L. B.; LU, X.; NIEVA, J. L.; BORCA, M. V. Effect of specific amino acid substitutions in the putative fusion peptide of structural glycoprotein E2 on Classical Swine Fever Virus replication. *Virology*, 2014.

FIGUEIREDO, H. C. P.; VIEIRA, P. R.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina a vírus em Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 1997.

FIRTH, C.; BHAT, M.; FIRTH, M.A.; WILLIAMS, S. H.; FRYE, M. J.; SIMMONDS, P.; CONTE, J. M.; NG, J.; GARCIA, J.; BHUVA, N. P.; LEE, B.; CHE, X.; QUAN, P. L.; LIPKIN, W. I. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *rattus norvegicus* in New York City. *mBio*, 2014.

FLORES, E. F. (3 ed.). *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 2017.

FLORES, E. F.; GIL, L. H. V. G.; BOTTON, S. A.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J. F.; KREUT, L. C.; PILATI, C.; DRIEMEYER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A. C. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Veterinary Microbiology*, Netherlands, 2000.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2005.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S.; GIL, L. H. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Research*, 2002.

FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S. A. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record*, England, 1999.

FULTON, R. W. Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus on control by vaccination. *Animal Health Research*, Rev, 16, 40-54, 2015.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, J. L.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programs. *Biologicals*, London, 2003a.

FULTON, R. W.; STEP, D. L.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; CONFER, A. W.; JOHNSON, B. J.; BRIGGS, R. E.; HAWLEY, R. V.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and mannheimiahaemolyticabacterin-toxoid. *Vaccine*, Netherlands, 2003b.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, 2003.

FULTON, R.W. Bovine respiratory disease research (1983–2009). *Animal health research reviews*. In: *Proceedings of the Conference of Research Workers in Animal*, 2009.

FULTON, R.W., BLOOD, K.S., PANCIERA, R.J., PAYTON, M.E., RIDPATH, J.F., CONFER, A.W., SALIKI, J.T., BURGE, L.T., WELSH, R.D., JOHNSON, B.J., RECK, A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2009a.

FULTON, R.W., HESSMAN, B.E., RIDPATH, J.F., JOHNSON, B.J., BURGE, L.J., KAPIL, S., BRAZIEL, B., KAUTZ, K., RECK, A. Multiple diagnostic tests to identify cattle with bovine viral diarrhoea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2009b.

FULTON, R.W.; STEP, D.L.; RIDPATH, J.F. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and *Mannheimia haemolytica* bacterin-toxoid. *Vaccine*, 2003.

GIAMMARIOLI, M.; LA ROCCA, S. A.; STEINBACH, F.; CASCIARI, C.; DE MIA, G. M. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Veterinary Microbiology*, 2011.

GILLESPIE, J. H.; BAKER, J. A.; McENTEE, K. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Veterinarian*, United States, 1960.

GIVENS, M. D.; NEWCOMER, B. W. Perspective on BVDV control programs. *Animal Health Research Reviews*, 2015.

GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, S.; MOENNIG, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. Biologicals, London, 2003.

GROOMS, D. L.; KEILEN, E. D. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2002.

HAMERS, C.; COUVREUR, B.; DEHAN, P.; LETELLIER, C.; FISCHER, L.; BRUN, A. J.; LEWALLE, P.; MICHAUX, C.; KERKHOF, P.; PASTORET, P. P. Assessment of the clinical and virological protection provided by a commercial inactivated bovine viral diarrhoea virus genotype 1 vaccine against a BVDV genotype 2 challenge. The Veterinary Record, England, 2003.

HAMERS, C.; DI VALENTIN, E.; LECOMTE, C.; LAMBOT, M.; JORISY, E. GENICOTY, B.; PASTORET, P. P. Virus Neutralising Antibodies Against 22 Bovine Viral Diarrhoea Virus Isolates in Vaccinated Calves. The Veterinary Journal, England, 2002.

HARASAWA, R. Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5'-untranslated region. Acta Virologica, 1996.

HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H. Demonstration and Genotyping of Pestivirus RNA from Mammalian Cell Lines. Microbiology and Immunology, 1995.

HARPIN, S., ELAHI, S.M., CORNAGLIA, E., YOLKEN, R.H., ELAZHARY, Y. The 5'- untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhoea virus. Archives of Virology, 1995.

HAUSE, B. M.; COLLIN, E. A.; PEDDIREDDI, L.; YUAN, F.; CHEN, Z.; HESSE, R. A.; GAUGER, P. C.; CLEMENT, T.; FANG, Y.; ANDERSON, G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. Journal of General Virology, 2015.

HAY, K.E., AMBROSE, R.C., MORTON, J.M., HORWOOD, P.F., GRAVEL, J.L., WALDRON, S., COMMINS, M.A., FOWLER, E.V., CLEMENTS, A.C., BARNES, T.S., MAHONY, T.J. Effects of exposure to Bovine viral diarrhoea virus 1 on risk of bovine respiratory disease in Australian feedlot cattle. Preventive Veterinary Medicine, 2016.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. Biologicals, 2003.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. Veterinary Microbiology, 1999.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. Veterinary Clinics of North America, 1995.

HOUE, H.; MEYLING, A. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence or infection in early pregnancy. Preventive Veterinary Medicine, Netherlands, 1991.

HOWARD, C. J. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). France, 1990.

JORDÃO, R. S. Resposta sorológica de cobaias imunizadas com vacinas inativadas, oleosa e aquosa, contendo isolado brasileiro do Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em comparação com vacina comercial. 2006. 60 f. Dissertação de Mestrado em Ciências (Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

KAMPAA, J.; K. STÅHLA, J. MORENO-LÓPEZA, A. CHANLUNC, A.; AIUMLAMAIE, S.; ALENIUS, S. BVDV and BHV-1 Infections in Dairy Herds in Northern and Northeastern Thailand, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2004.

KAWANISHI, N.; TSUDUKU, S.; SHIMIZU, H.; OHTANI, Y.; KAMEYAMA, K.; YAMAKAWA, M.; TSUTSUI, T.; MATSUURA, K.; OHASHI, S.; ISOBE, T.; YAMADA, S. First isolation of border disease virus in Japan is from a pig farm with no ruminants. *Veterinary Microbiology*, 2014.

KIM, I. J.; HYUN, B. H.; SHIN, J. H.; LEE, K. K.; LEE, K. W.; CHO, K. O.; KANG, M. L. Identification of Bovine Viral Diarrhea Virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). *Virus Research*, Netherlands, 2006.

KIMMAN, T. G.; BIANCHI, A. T.; WENSVOORT, G.; de BRUIN, T. G.; MELIEFSTE, C. Cellular Immune Response to Hog Cholera Virus (HCV): T Cells of Immune Pigs Proliferate In Vitro upon Stimulation with Live HCV, but the E1 Envelope Glycoprotein Is Not a Major T-Cell Antigen. *Journal of Virology*, 1993.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980.

KIRKLAND, P. D.; RICHARDS, S. G.; ROTHWELL, J. T.; STANLEY, D. F. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *The Veterinary Record*, England, 1991.

KIRKLAND, P. D.; FROST, M. J.; KING, K. R.; FINLAISON, D. S.; HORNITZKY, C. L.; GU, X.; RICHTER, M.; REIMANN, I.; DAUBER, M.; SCHIRRMIEIER, H.; BEER, M.; RIDPATH, J. F. Genetic and antigenic characterization of Bungowannah virus, a novel pestivirus. *Veterinary Microbiology*, 2015.

KULANGARA, V.; JOSEPH, A.; THRITHAMARASSERY, N.; SIVASAILAM, A.; KALAPPURACKAL, L.; MATTAPPILLIL, S.; SYAM, R.; MAPRANATH, S. Epidemiology of bovine viral diarrhoea among tropical small holder dairy units in Kerala, India. *Tropical Animal Health and Production*, 2015.

KUMMERER, B. M.; MEYERS, G. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *Journal of Virology*, 2000.

KUMMERER, B. M.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; THIEL, H.; MEYERS, G. The Genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, Netherlands, 2000.

KUPFERMANN, H.; THIEL, H. J.; DUBOVI, E. J.; MEYERS, G. Bovine viral diarrhoea virus: characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions. *Journal of Virology*, 1996.

LANYON, S. R.; REICHEL, M. P. Bovine viral diarrhoea virus ('pestivirus') in Australia: to control or not to control? *Australian Veterinary Journal* Volume, 2014.

LARSKA, M.; POLAK, M. P.; RIITHO, V.; STRONG, R.; BELÁK, S.; ALENIUS, S.; UTTENTHAL, Å.; LIU, L. Kinetics of single and dual infection of calves with an Asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea virus 1. *Comparative Immunology Microbiology and Infection Diseases*, 2012.

LI, L.; LOK, S. M.; YU, I. M.; ZHANG, Y.; KUHN, R. J.; CHEN, J.; ROSSMANN, M. G. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science*, 2008.

LIANG, D.; SAINZ, I. F.; ANSARI, I. H.; GIL, L. H.; VASSILEV, V.; DONIS, R. O. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *Journal of General Virology*, 2003.

LINDBERG, A. L.; ALENIUS S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology*, 1999.

LIU, L.; XIA, H.; BAULE, C.; BELÁK, S. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Archives of Virology*, 2009.

LOKEN, T. Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, United States, 1995.

LOKEN, T.; KROGSRUD, J.; LARSEN, I. L. Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, shepp and pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, England, 1991.

LOWINGS, P.; IBATA, G.; NEEDHAM, J.; PATON, D. Classical swine fever virus diversity and evolution. *Journal of General Virology*, 1996.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Flaviviridae. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. *Fenner's Veterinary Virology*. 4. ed. London: Academic Press, 2011.

MAHMOUD, M.A.; ALLAM A.M. Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus Type 1 (BHV-1), Parainfluenza Type 3 Virus (PI3V) and Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) among non-Vaccinated Cattle, *Global Veterinaria*, 2013.

MAKOSCHEY, B.; JANSSEN, M. G.; VRIJENHOEK, M. P.; KORSTEN J. H.; MAREL, P. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine*, Netherlands, 2001.

MAURER, K.; KREY, T.; MOENNIG, V.; THIEL, H. J.; RÜMENAPF, T. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Journal of Virology*, 2004.

McCLURKIN, A.W., BOLIN, S.R., CORIA, M.F. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically



affected with bovine viral diarrhoea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1985.

MENDEZ, E.; RUGGLI, N.; COLLETT, M. S.; RICE, C. M. Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 1998.

MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; TAUTZ, N.; DUBOVI, E. J.; THIEL, H. J. Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhoea virus. *Archives of Virology, Supplementum. Austria*, 1991.

MEYERS, G.; TAUTZ, N.; STARK, R.; BROWNLIE, J.; DUBOVI, E. J.; COLLETT, M. S.; THIEL, H. J. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, 1992.

MEYERS, S.; SCHAUER, W.; BALZI, E.; WAGNER, M.; GOFFEAU, A.; GOLIN, J. Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR5. *Current Genetics*, 1992.

MEYLING, A.; HOUE, H.; JENSEN, A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique, France*, 1990.

MISHRA, N.; RAJUKUMAR, K.; PATERIYA, A.; KUMAR, M.; DUBEY, P.; BEHERA, S. P.; VERMA, A.; BHARDWAJ, P.; KULKARNI, D. D.; VIJAYKRISHNA, D.; REDDY, N. D. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Veterinary Microbiology*, 2014.

MOENNIG, V.; EICKEN, K.; FLEBBE U.; FREY, H. R.; GRUMMER, B.; HAAS, L.; GREISER-WILKE, I.; LIESS, B. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Preventive Veterinary Medicine*, 2005.

MOERMAN, A.; STRAVER, P.J.; JONG, M.C.M.; de QUAK, J. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Centraal Diergeneeskundig Inst. DLO, Lelystad (Netherlands)*, 1994.

MULLER, T.; DEPNER, K. R.; BUROW, J.; AHL, R.; CONRATHS, F. J.; MOENNIG, V. Comparison of different BVD virus strains for their use in the differential diagnosis of classical swine fever--an attempt to standardize neutralization tests. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, Germany*, 1997.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. *Herpesviridae. Veterinary Virology*. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1999.

NAGAI, M., M. HAYASHI, S. SUGITA, Y. SAKODA, M. MORI, T. MURAKAMI, T. OZAWA, N. YAMADA, H. AKASHI. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Research*, 2004.

NAGAI, M.; HAYASHI, M.; ITOU, M.; FUKUTOMI, T.; AKASHI, H.; KIDA, H.; SAKODA, Y. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes*, 2008.

NEIL, J. D., *Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. Biologicals*, 2013.

NISKANEN, R.; LINDBERG, A.; LARSSON, B.; ALENIUS, S. Primarily BVDV-infected calves as transmitters of the infection. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 19. Edinburgh. Proceedings, United Kingdom: British Cattle Veterinary Association, 1996.

NOBIRON, I.; THOMPSON, I.; BROWNLIE, J.; COLLINS, M. E. DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. Vaccine, Netherlands, 2003.

NOGUEIRA, F. S. Diagnóstico da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em propriedades da microrregião de viçosa. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2003.

OIE. Bovine Viral Diarrhea, 2015.

OIE. Office International des Epizooties - World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008. Disponível em <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08\\_BVD.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf)>. Updated 17/07/08. Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

O'MAHONY, L.; MCCARTHY, J.; Kelly, P.; HURLEY, G.; LUO, F.; CHEN, K.; O'SULLIVAN, G. C.; KIELY, B.; COLLINS, J. K.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E. M. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. Gastroenterology, 2005.

PATON, D. J. Pestivirus diversity. Journal of Comparative Pathology, England, 1995.

PATON, D. J.; MCGOLDRICK, A.; GREISER-WILKE, I.; PARCHARIYANON, S.; SONG, J. Y.; LIU, P. P.; STADEJEK, T.; LOWINGS, J. P.; BJÖRKLUND, H.; BELÁK, S. Genetic typing of classical swine fever virus. Veterinary Microbiology, 2000.

PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; LEITE, R. C. Seropositivity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in Zebu cows in the Brazilian Pantanal. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 1997.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology, United States, 1994.

PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H.; M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. Veterinary Research, 2010.

PETERHANS, E.; JUNGI, T. W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. Biologicals, England, 2003.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVIRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. Anais... Santa Maria, Rio Grande do sul, 1998.

PIZARRO-LUCERO, J., M. O.; CELEDÓN, M. AGUILERA, A. C., Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary Microbiology*, 2006.

PIZARRO-LUCERO, J.; CELEDON, M.O.; AGUILERA, M.; de CALISTO, A. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary Microbiology*, 2006.

POCOCK, D. H., HOWARD, C. J., CLARKE, M. C.; BROWNLIE, J. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. *Archives of Virology*, 1987.

POOLE, T. L.; WANG, C.; POPP, R. A.; POTGIETER, L. N.; SIDDIQUI, A.; COLLETT, M. S. Pestivirus Translation Initiation Occurs by Internal Ribosome Entry. *Virology*, 1995.

POSTEL, A.; SCHMEISER, S.; PERERA, C. L.; RODRÍGUEZ, L. J.; FRIAS-LEPOUREAU, M. T.; BECHER, P. Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1. *Veterinary Microbiology*, 2013.

POTGIETER, L. N. Immunology of bovine viral diarrhoeavirus. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, United States, 1995.

QI, F.; RIDPATH, J. F.; LEWIS, T.; BOLIN, S. R.; BERRY, E. S. Analysis of the bovine viral diarrhoea virus genome for possible cellular insertions. *Virology*, 1992.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. 343–350, 2012. REED, L., J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 1938.

RICHTZENHAIN, L. J.; BARBARINI, O.; UMEHARA, O.; DE GRACIA, A. S.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA, F.; SOARES, R. M. Diarréia Viral Bovina: levantamento sorológico nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 1999.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoeavirus: global status. *The Veterinary clinics of North America: Food animal practice*, 2010.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, London, 2003.

RIDPATH, J. F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Preventive Veterinary Medicine*, Netherlands, 2005.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, United States, 1994.

RIDPATH, J. F.; FULTON, R. W.; KIRKLAND, P. D.; NEILL, J. D. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated

from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2010.

RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; PETERHANS, E. Impact of variation in acute virulence of BVDV strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine*, Netherlands, 2007.

RIDPATH, J.F., FULTON, R.W., KIRKLAND, P.D., NEILL, J.D. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2010.

RIEDEL, C.; LAMP, B.; HAGEN, B.; INDIK, S.; RÜMENAPF, T. The core protein of a pestivirus protects the incoming virus against IFN-induced effectors. *Scientific Reports*, 2017.

ROBSON, D. S.; GILLESPIE, J. H.; BAKER, J. A. The neutralization test as an indicator of immunity to virus diarrhoea. *The Cornell Veterinarian*, United States, 1960.

ROEHE, P. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; MUNOZ, J. C. P. A situação do vírus da diarréia viral bovina no país. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVIRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. Anais... Santa Maria, Rio Grande do Sul, 1998.

RONECKER, S.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *The Journal of General Virology*, 2008.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, 2004.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, Netherlands, 1999.

SANDVIK, T. Selection of diagnostic assays for BVD control programmes. Disponível em: <http://www.bvdv-control.org>, 2004. Acesso em: 15/05/2017.

SAUSKER, E. A.; DYET, N. M. Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1 and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, United States, 2002.

SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Inhibits Double-Stranded. *Journal of Virology*, United States, 2001.

SILVEIRA S.; WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; da SILVA, M. S.; STRECK, A. F.; PESCADOR, C. A.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; RIDPATH, J. F.; CANAL, C. W. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017.

SILVEIRA, S.; BAUMBACH, L. F.; WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; da SILVA, M. S.; CIBULSKI, S. P.; BORBA, M. R.; MAIA, R. D.; COIMBRA, V. C. S.; de

MORAES G. M.; RIDPATH, J. F.; CANAL, C. W. HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; SMITH, D. B.; STAPLETON, J. T. and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 2017.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; SMITH, D. B.; STAPLETON, J. T. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 2017.

SMITH, D.B.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E.A.; MEYERS, G.; et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *Journal of General Virology*, 2016.

STARK, R.; MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H. J. Processing of Pestivirus Polyprotein: Cleavage Site between Autoprotease and Nucleocapsid Protein of Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, 1993.

STOFFREGEN, B., BOLIN, S.R., RIDPATH, J.F., POHLENZ, J. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Veterinary Microbiology*, 2000.

TAJIMA, M.; FREY, H. R.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; MOENNIG, V.; SCHOLZ, H.; GREISER-WILKE, I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research*, 2001.

TAUTZ, N.; TEWS, B. A.; MEYERS, G. *The Molecular Biology of Pestiviruses*. 1. Ed. Elsevier Inc., 2015.

TAUTZ, N.; MEYERS, G.; STARK, R.; DUBOVI, E. J.; THIEL, H. J. Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *Journal of Virology*, 1996.

TAUTZ, N.; MEYERS, G.; STARK, R.; DUBOVI, E. J.; THIEL, H. J. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *Journal of Virology*, 1994.

THABTI, F.; LETELLIER, C.; HAMMAMI, S.; PÉPIN, M.; RIBIÈRE, M.; MESPLÈDE, A.; KERKHOFS, P.; RUSSO, P. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Archives of Virology*, 2005.

THIEL, H. J.; STARK, R.; WEILAND, E.; RÜMENAPF, T.; MEYERS, G. Hog Cholera Virus: Molecular Composition of Virions from a Pestivirus. *Journal of Virology*, 1991.

THURNER, C.; WITWER, C.; HOFACKER, I. L.; STADLER, P. F. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *Journal of General Virology*, 2004.

TIJSSEN, P., PELLERIN, C., LECOMTE, J., van den HURK, J. Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology*, 1996.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Medicine*, United States, 1996.

UDDIN, M. A., AHASAN, A., ISLAM, K., ISLAM, M. Z., MAHMOOD, A., ISLAM, A., ISLAM, K., ... Ahad, A. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus in crossbred dairy cattle in Bangladesh. *Veterinary World*, 2017.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no Rio Grande do Sul. *Boletim Instituto Pesquisas Desidério Finamor*, Porto Alegre, 1974.

VILCEK, S. Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses. *Veterinary Medicine*, 1994.

VILCEK, S., DURKOVIC, B., KOLESAROVA, M. and PATON, D. J. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine*, 2005.

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 of Virology*, 1994.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B.; STROJNYM L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M. T.; PAIFI, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology*, 2001.

WEBER, M. N., S. SILVEIRA, G. MACHADO, F. H. S. GROFF, A. C. S. MOSENA, R. F. BUDASZEWSKI, P. M. DUPONT, L. G. CORBELLINI, C. W. CANAL. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*, 2014.

WEBER, M.N.; GALUPPO, A.G.; BUDASZEWSKI, R.F.; CORBELLINI, A.O.; MÓSENA, A.C.S.; PINTO, L.D.; MARQUES, LS.; RODRIGUES, J. L.; CANAL, C.W. Evaluation of pre-nucleic acid extraction for increasing sensitivity of detection of virus in bovine follicular fluid pools. *Theriogenology*, 2013.

WOODARD, L. F. BVD virus associated with outbreaks of abortion, stillbirths, and weak calves. *Veterinary Medicine*, United States, 1994.

WORKMAN, A. M., M. P. HEATON, G. P. HARHAY, T. P. L. SMITH, D. M. GROTELUESCHEN, D. SJEKLOCHA, B. BRODERSEN, J. L. PETERSEN, C. G. CHITKO-MCKOWN. Resolving bovine viral diarrhoea virus subtypes from persistently infected U.S. beef calves with complete genome sequence. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016.

WU, Z.; REN, X.; YANG, L.; HU, Y.; YANG, J.; HE, G.; ZHANG, J.; DONG, J.; SUN, L.; DU, J.; LIU, L.; XUE, Y.; WANG, J.; YANG, F.; ZHANG, S.; JIN, Q. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *Journal of Virology*, 2012.

ZUPANCIC, A.; JIJKIC, B.; LOJKIC, M.; CAC, Z.; JEMERSIC, L.; STARESINA, V. Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine

reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. *Journal of Veterinary Medicine, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 2002.