

Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul¹

Adriana S. Santos², Nadia A.B. Antoniassi³, Fabiana M. Boabaid³, Ana P.G. Bitencourt³, Laura L. Almeida³, Cláudio W. Canal⁴, Eduardo Furtado Flores⁵ e David Driemeier^{3*}

ABSTRACT- Santos A.S., Antoniassi, N.A.B., Boabaid F.M., Bitencourt A.P.G., Almeida L.L., Canal C.W., Flores E.F. & Driemeier D. 2011. [**Clinical, pathological, immunohistochemical and viral aspects of five calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus in a farm of Rio Grande do Sul, Brazil.**] Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(10):885-892. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is responsible for different syndromes that affect cattle worldwide causing important economic losses. This study analyzed the clinical, pathological, immunohistochemical and viral aspects of persistent infection by BVDV in five animals of a farm located in the county of Viamão, Rio Grande do Sul, southern Brazil. The clinical signs included growth impairment, nasal and ocular discharge and, in two animals, congenital cataract. The main gross lesions observed at the necropsy were enlargement of mesenteric lymph nodes and Peyer's patches, and in one case, pododermatitis and crusted lesions on nasal planum and periocular region. Microscopic findings were characterized mostly by mononuclear infiltrate in the lamina propria, primarily in the small intestine and lymphoid depletion with histiocytic infiltrate in follicular centers of lymph nodes and Peyer's patches. Viral antigens were more frequently demonstrated in epidermal keratinocytes, epithelium of hair follicles and dendritic cells of the dermis of the ears and skin, histiocytes and lymphocytes in lymph nodes, thyroid follicular cells, in the cytoplasm of neurons and to a lesser extent, in glial cells in the cerebral cortex and hippocampus. Viral isolation from blood samples and organs confirmed the presence of non-cytopathic BVDV. Moreover, viral RNA was detected by RT-PCR in serum samples. Phylogenetic analysis of a partial fragment of the^{5'} non-translated region of the viral genome allowed the classification of the sample as BVDV type 2b. The present study strengthens the need to investigate and to characterize BVD outbreaks and to describe its different clinic-pathological presentations.

INDEX TERMS: BVDV, persistent infection, antigen detection, congenital cataract, genotyping, diagnosis.

¹ Recebido em 27 de maio de 2011.

Aceito para publicação em 28 de julho de 2011.

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, defendida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em 8 de fevereiro de 2010.

² Setor de Patologia Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG), Cx. Postal 131, Goiânia, GO 74001-970, Brasil.

³ Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

⁴ Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91540-000, Brasil.

⁵ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

RESUMO.- O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é responsável por diferentes síndromes que afetam bovinos em todo o mundo, causando grandes perdas econômicas. O presente trabalho analisou as características clínicas, patológicas e imuno-histoquímicas e virais de cinco bovinos persistentemente infectados pelo BVDV de uma mesma propriedade, localizada no Município de Viamão, Rio Grande do Sul. Dentre os sinais clínicos verificados destacaram-se subdesenvolvimento, secreções nasais e oculares, além de catarata congênita unilateral em dois bovinos. As principais lesões observadas durante a necropsia consistiram de aumento dos linfonodos mesentéricos, evidenciação das placas de Peyer e pododermatite e lesões crostosas no plano nasal e na região periocular em um animal. Os achados microscópicos caracterizavam-se, principalmente, por infiltrado mononuclear na lâmina do intestino delgado e rarefação linfóide com infiltrado histiocitário nos centrofoliculares de linfonodos e nas placas de Peyer. Antígenos virais foram detectados por imuno-histoquímica principalmente em queratinócitos da epiderme, no epitélio de folículos pilosos e células mononucleares da derme de orelhas e pele; histiócitos e em linfócitos dos linfonodos; células foliculares da tireoide; no citoplasma de neurônios e, em menor escala, em células da micróglia no córtex cerebral e no hipocampo. O isolamento viral de amostras de sangue e órgãos dos animais confirmou a presença de BVDV não citopático. Também foi possível detectar a presença do genoma viral por RT-PCR no soro dos animais. A análise filogenética do fragmento parcial da região 5' não traduzida do genoma viral permitiu a classificação da amostra viral como BVDV tipo 2b. O presente estudo reforça a necessidade de investigar e caracterizar surtos de BVD e descrever suas diferentes formas de apresentação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BVDV, infecção persistente, detecção antigênica, catarata congênita, genotipagem, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

O termo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) refere-se a duas espécies virais diferentes, BVDV tipo 1 (BVDV-1) e BVDV tipo 2 (BVDV-2). Ambas são genética e antigenicamente relacionadas e pertencem ao gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* (Ridpath 2005). O BVDV-2 predomina na América do Norte (Fulton et al. 2000, Tajima & Dubovi 2005), mas também vem sendo identificado na América do Sul (Canal et al. 1998, Flores et al. 2000, Flores et al. 2005), com relatos ocasionais na Europa (Fulton et al. 2005).

Animais persistentemente infectados (PI) pelo BVDV são fontes primárias de disseminação do vírus nos rebanhos (Grooms 2004). Por este motivo, tais animais são os principais alvos de programas de controle e erradicação da doença em diversos países (Houe et al. 2005, Van Campen 2010). A geração de bovinos PI ocorre durante a fase inicial da gestação, entre 40 e 120 dias, quando vacas prenhes são infectadas por BVDV não citopático (McClurkin et al. 1984, Liebler-Tenorio 2005, Ridpath & Flores 2007).

A diarreia viral bovina (BVD) apresenta distribuição mundial, é endêmica em muitos países e geralmente, ocasiona importantes perdas econômicas à bovinocultura

(Goens 2002). A infecção tem sido associada a uma variedade de manifestações clínicas ou assintomáticas. A forma de apresentação da enfermidade pode estar relacionada à localização geográfica, às práticas de manejo adotadas, à imunidade do rebanho e ao tipo viral envolvido (Houe et al. 2005).

A detecção de antígenos do BVDV em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina pelo método de imuno-histoquímica (IHQ) foi descrito por Haines et al. (1992) e tem sido amplamente utilizado no diagnóstico da infecção aguda ou persistente e em casos de abortos ou neonatos (Brodersen 2004, Liebler-Tenorio et al. 2004, Saliki & Dubovi 2004). Mais recentemente, a IHQ de biópsia de orelha tem ganhado aplicação importante na triagem de animais PIs em rebanhos bovinos. Embora mais laborioso que o ELISA de captura, este método pode ser utilizado na detecção de antígenos virais em animais jovens por não sofrer interferência de anticorpos maternos (Njaa et al. 2000, Grooms & Keilen 2002, Brodersen 2004).

O presente trabalho teve por finalidade descrever as alterações clínicas e patológicas dos bovinos PIs identificados em uma propriedade de gado de corte localizada no Estado do Rio Grande do Sul e realizar a caracterização genética do vírus envolvido.

MATERIAL E MÉTODOS

Bovinos e propriedade analisada

Ao final do ano de 2007, uma necropsia realizada pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV/UFRGS) detectou um animal infectado, provavelmente PI, pelo BVDV (Bovino 1). A propriedade de origem do animal localizava-se no Distrito de Itapuã, Município de Viamão, Rio Grande do Sul e destinava-se ao cultivo de arroz e criação de gado de corte da raça Angus. Possuía um rebanho total de 1300 animais.

As informações referentes ao histórico de rebanho e sinais clínicos prévios foram obtidas junto ao veterinário responsável e por auxiliares da fazenda. Para investigar a possível presença de outros animais PI, durante os anos de 2008 e 2009, coletaram-se sangue e biópsia de orelha de 173 bezerros com idade entre três e seis meses e de quatro vacas e duas novilhas com problemas reprodutivos crônicos. Três animais que foram identificados como PIs (Bovinos 3, 4 e 5) foram alojados posteriormente em baias isoladas SPV/UFRGS, para avaliação de parâmetros clínicos e análise de hemograma realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS. O procedimento de necropsia foi realizado em animais que morreram de forma natural ou que sofreram eutanásia. Os achados macroscópicos identificados foram avaliados. Para exame microscópico, coletaram-se olhos, fragmentos de orelha ou pele, cérebro, cerebelo, medula espinhal, gânglio trigeminal, hipófise, linfonodo submandibular, linfonodo mesentérico, tonsila, linfonodo hepático, linfonodo mediastínico, baço, timo, pulmão, traqueia, esôfago, rúmen, omaso, retículo, abomaso, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon espiral e reto), tireoide, rim, medula óssea, adrenal, coração e fígado. Estes fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% por 24 horas. O processamento posterior foi realizado segundo as técnicas de rotina histológica, seguida da embebição em parafina. Foram confeccionadas lâminas para coloração de hematoxilina e eosina (HE) e lâminas de poli-L-lisina para IHQ.

Do Bovino 2, com suspeita de babesiose cerebral, foram feitas impressões do córtex cerebral e coloração destas lâminas pelo método do Panótico Rápido® (Laborclin, Brasil).

Coleta de amostras de orelha

A biopsia de orelha foi realizada na propriedade por membros do SPV/UFRGS ou pelo veterinário responsável para identificação de animais PIs. Durante a coleta, a troca do material utilizado (tesoura romba reta) foi realizada para cada animal, sendo lavado e desinfetado em solução de iodo, para uso posterior. Pequenos fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,5 cm de largura foram coletados da ponta do pavilhão auricular e acondicionados em tubos de ensaio contendo solução de formol a 10% por 24 horas. Este material foi desidratado em soluções crescentes de álcool etílico, diafinizado em xilol e incluído em parafina. Posteriormente, foram feitos cortes de 5 µm em lâminas de poli-l-lisina para uso no teste imuno-histoquímico.

Isolamento viral

Para tentativa de isolamento viral, sangue com anticoagulante (EDTA) dos animais positivos na IHQ e, posteriormente, amostras de pulmão, baço e timo dos animais necropsiados também foram submetidas ao isolamento viral no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. Este mesmo teste foi realizado no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, em fragmentos de pele do Bovino 1.

Imuno-histoquímica

A IHQ foi realizada em cortes dos órgãos acima citados, excetuando-se coração e fígado. Para realização da mesma, pequenas alterações foram realizadas no protocolo previamente padronizado por Schmitz (2006). O anticorpo primário monoclonal comercial anti-BVDV 15C5 (Syracuse, Estados Unidos) foi diluído 1:500 em uma solução de tampão fosfato salina (PBS). A recuperação antigênica foi feita com protease XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Mo) a 0,005% em PBS por 15 minutos a 37°C e as marcações inespecíficas foram reduzidas a partir da utilização de solução de leite desnatado (Molico®) a 5% em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi aplicado por 14 a 16 horas a 4°C, em câmara úmida. Posteriormente, utilizou-se anticorpo secundário biotilado e solução de estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (LSAB + System AP, DakoCytomation) por 20 minutos cada, a temperatura ambiente. A solução reveladora consistiu de 100 µL da solução do cromógeno *Permanent Red* (DakoCytomation) que foi aplicado sobre as lâminas por 15 minutos. Fez-se contracoloração com hematoxilina por 20 segundos, seguida de lavagem em água e secagem em ar corrente, para posterior passagem em xilol e montagem com Entellan. Lâminas controle positivo de córtex cerebral e de biópsia de orelha foram inseridas em série com as lâminas a serem testadas. Para os controles negativos, substituiu-se o anticorpo primário por PBS.

Amplificação e detecção de genoma viral

A amplificação de um fragmento da região 5' não traduzida do RNA viral foi realizada a partir de amostras de soro dos animais infectados previamente detectados no teste de IHQ. Para tanto, as amostras foram submetidas a extração por TRizol®/LS (Invitrogen, Estados Unidos) e subsequente teste da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), utilizando-se os iniciadores 324 e 326 (Vilcek et al. 1994) e kit comercial "Superscript®One Step RT-PCR com Platinum®Taq" (Invitrogen, Estados Unidos). Na etapa seguinte, os produtos de amplificação de 288 pares de bases foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% com 0,1 µg/mL de "Blue green loading dye I" (LGC Biotecnologia, Brasil), em tampão de Tris-ácido acético-EDTA (Sambrook et al. 1989).

Para triagem de PIs da temporada de parição, foram colhidas amostras de soro de 110 bezerros com menor desenvolvimento no momento do desmame em abril de 2009. As amostras individuais foram reunidas em "pool" de 10 amostras e, posteriormente, submetidas ao RT-PCR para BVDV.

Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos de amplificação foram purificados através de kit "GFX DNA Purification" (Amersham Bioscience, Estados Unidos). O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Estados Unidos). As sequências de nucleotídeos foram revisadas e montadas usando software Staden Package v.2.0. Alinhamentos e comparações do fragmento parcial da região 5' não traduzida (243 pares de bases) foram realizadas pelo método Clustal X 2.1 usando software MEGA V.5 (Tamura et al. 2007). A análise filogenética foi baseada no método "Neighbor-joining" (Saitou & Nei 1987) e os parâmetros estatísticos foram determinados por análises de 1.000 replicatas (Felsenstein 1985) utilizando sequências de referência de BVDV-1 e BVDV-2 depositadas no GenBank.

RESULTADOS

No presente trabalho, a IHQ foi positiva em cinco animais dos 179 investigados. Também foi possível isolar BVDV não citopático de amostras dos mesmos. RNA viral foi detectado no teste RT-PCR para BVDV nos cinco animais necropsiados e os produtos de amplificação obtidos de três deles, Bovino 1, Bovino 3 e Bovino 4 foram sequenciados e analisados. Como as três sequências apresentaram 100% de homologia, esta sequência de 243 pares de bases passou a ser denominada Itapuã 08. A análise usou os grupos filogenéticos propostos por Vilcek et al. (2001) e Flores et al. (2002) e permitiu classificar o vírus como BVDV-2b (Fig.1). O padrão de marcação na IHQ e a repetição do teste de RT-PCR após 30 dias nos Bovino 3, Bovino 4 e Bovino 5 confirmaram a infecção persistente pelo vírus nos animais estudados. Por outro lado, a triagem dos bezerros de 2009 realizada pelo teste RT-PCR para BVDV identificou outros dois animais infectados pelo BVDV, que não puderam ser mais estudados porque vieram a óbito antes de novas análises. Abaixo, estão descritas as alterações clínicas e anatomicopatológicas observadas nos cinco bovinos PI identificados no presente estudo.

Bovino 1

Um bovino macho, da raça Angus, com dois anos de idade, apresentava apatia, subdesenvolvimento e lesões crostosas acompanhadas de secreção mucopurulenta na região ocular. Estas lesões também eram observadas no focinho e região interdigital dos membros pélvicos e torácicos (Fig.2A). Este animal estava relutante em caminhar e apresentava-se levemente desidratado.

Durante a necropsia, verificou-se pequena área de erosão (2cm) na base da língua e evidênciação da polpa branca no baço. À microscopia, havia no plano nasal e língua, proliferação acantomatosa do epitélio difusa acentuada, necrose e degeneração multifocal acentuada do estrato córneo, muitas vezes associada a infiltrado inflamatório de neutrófilos e fo-

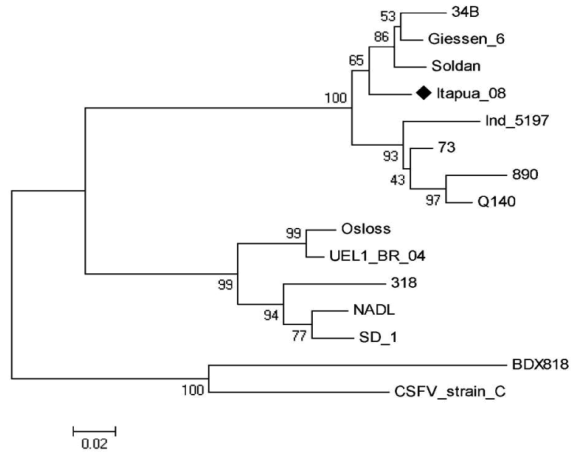


Fig.1. Análise filogenética de fragmento de 243 nucleotídeos da região 5' não traduzida (5'UTR) da amostra Itapua 08. Os números indicam a percentagem de 1000 replicatas de "bootstrap" que suportam cada ramo filogenético. A árvore foi preparada usando o programa Clustal X 2.1 e baseada no método "Neighbor-joining" parâmetro Kimura dois. O alinhamento múltiplo foi realizado em programa MEGA V.5. Lista das amostras referência usadas e seus respectivos números de acesso de GenBank: 34B (AF244952), Giessen 6 (AY379547), Soldan (U94914), Ind 5197 (EF547201), 73 (FJ431194), 890 (U18059), Q140 (L32889), Osloss (M96687), UEL1 - BR 04 (EF406123), 318 (AF244958), NADL (M31182), SD 1 (M96751), CSFV strain C (Z46258) e BDX818 (AF037405).

cos de ulceração. Na junção derme-epiderme havia edema e infiltrado mononuclear multifocal moderado (Fig.2B).

Linfonodos e baço apresentavam moderado infiltrado de histiócitos na região centrofolicular. As alterações nos intestinos consistiam de infiltrado mononuclear em lâmina própria e dilatação de vasos lacteais.

Bovino 2

Uma fêmea da raça Angus com idade entre três e quatro meses, apresentando subdesenvolvimento e opacidade de cristalino unilateral congênita (Fig.3A). Durante o procedimento de necropsia, observou-se aumento dos

linfonodos mesentéricos e coloração vermelho-cereja do córtex cerebral. Ao exame citológico de impressões de córtex cerebral coradas pelo Panótico Rápido® detecta-

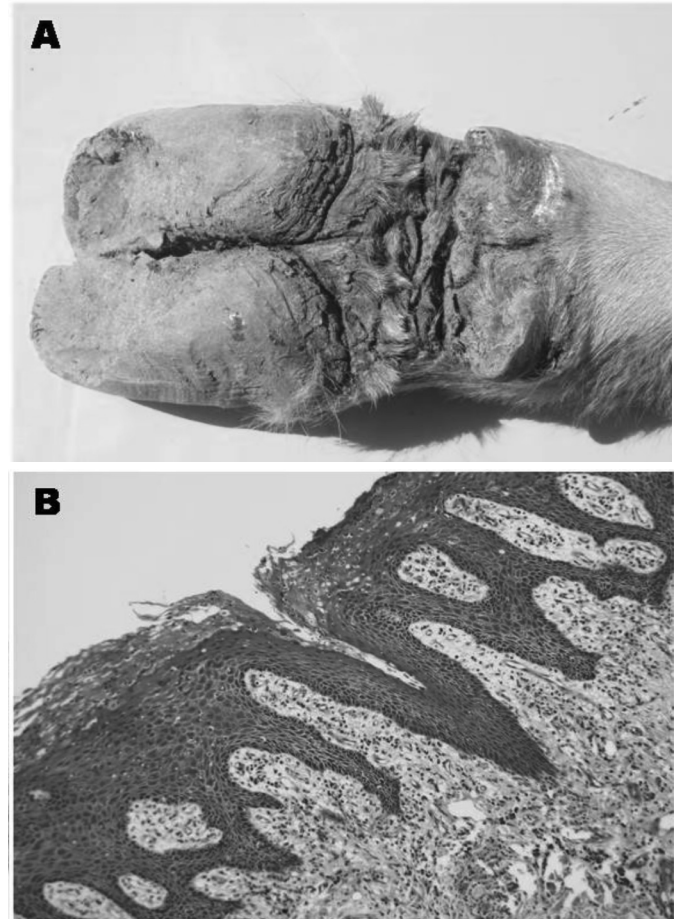


Fig.2. Bovino 1, macho, raça Angus. (A) Dermatite crostosa afetando a pele digital ventral e espaço interdigital. (B) Epitélio do plano nasal apresentando proliferação acantomatosa, áreas de necrose do estrato córneo associado a infiltrado inflamatório de neutrófilos. Edema e infiltrado mononuclear multifocal moderado na junção derme-epiderme. HE, obj.20x.

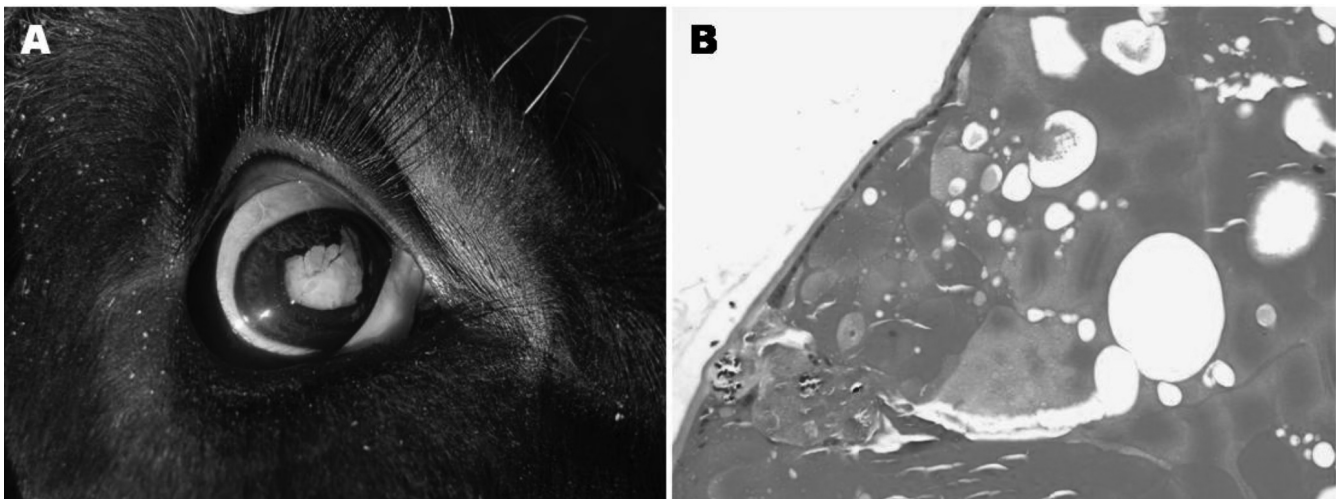


Fig.3. Bovino 2, fêmea, raça Angus. (A) Detalhe do olho demonstrando a opacidade quase total do cristalino. (B) Vacuolizações multifocais e tumefação (seta) de fibras da camada cortical. HE, obj.20x.

ram-se inúmeras hemácias parasitadas por *Babesia bovis* em capilares. A histologia revelou congestão difusa acentuada do córtex cerebral, infiltrado mononuclear multifocal moderado no intestino delgado e infiltrado de histiócitos em centrolímbicos de linfonodos e placas de Peyer.

As lesões oculares restringiam-se ao cristalino. Neste, notou-se arranjo irregular, tumefação e vacuolizações das fibras do cristalino, havendo ainda, foco discreto de mineralização (Fig. 3B). Estas lesões degenerativas eram localizadas predominantemente no córtex (catarata cortical).

Bovinos 3, 4 e 5

Estes bovinos foram encaminhados ao SPV/UFRGS com idade de dois a três meses. Todos eram da raça Angus, sendo os Bovinos 3 e 5 machos e o Bovino 4, uma fêmea.

Durante a permanência destes animais no SPV/UFRGS, verificou-se no Bovino 4 catarata bilateral, diarreia líquida com duração de 22 dias, seguida de prostração e morte. O Bovino 3 morreu após apresentar-se prostrado por um período de 4 dias. Secreção nasal bilateral, nos primeiros 15 dias após sua transferência para o SPV-UFRGS, foi a única alteração observada no Bovino 5. Este animal, apesar do subdesenvolvimento, apresentava-se saudável completando a idade de um ano e nove meses, quando sofreu eutanásia. Não foram constatadas outras alterações clínicas ou no hemograma durante o período de avaliação destes animais.

Dentre as alterações macroscópicas identificadas durante a necropsia dos três animais destacam-se: aumento moderado dos linfonodos mesentéricos (3/3), evidenciação moderada das placas de Peyer (3/3), leve evidenciação dos vasos linfáticos do mesentério (2/3), ulcerações focais de aproximadamente 1 cm de diâmetro na base da língua (1/3), pontos brancos multifocais na superfície cortical dos rins direito e esquerdo (1/3), pequenas ulcerações nas placas de Peyer e atrofia de timo (1/3).

As alterações microscópicas consistiram de infiltrado inflamatório mononuclear leve a acentuado no intestino delgado (3/3) e dilatações de vasos lacteais (2/3), depleção linfóide e infiltrado de histiócitos leve a moderado em linfonodos, tonsila e placas de Peyer (3/3), necrose do epitélio de vilosidades (1/3), ulceração focal moderada do epitélio da língua com infiltrado de neutrófilos (1/3), infiltrado mononuclear intersticial multifocal moderado nos rins (1/3) e metaplasia leve do epitélio de brônquios (1/3).

No Bovino 4, as lesões oculares foram semelhantes às descritas para o Bovino 2.

Avaliação imuno-histoquímica

No Quadro 1, estão resumidas as marcações imuno-histoquímicas encontradas nos cinco animais PI analisados.

As marcações no córtex, hipocampo e tálamo foram mais evidentes no citoplasma de neurônios e, em menor proporção, em células endoteliais dos capilares e em células da micróglia (Fig.4). No cerebelo, discreta marcação foi observada em neurônios de Golgi e em células endoteliais.

Quadro 1. Distribuição e quantificação da marcação imuno-histoquímica em órgãos coletados de cinco animais persistentemente infectados (PI) para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

Órgãos	Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 4	Bovino 5
Orelha/pele	+++	+++	+++	+++	+++
Olho	NC	+	+	+	+
C.frontal	+++	+++	+++	+++	+++
Tálamo	+++	+++	+++	+++	+++
Hipocampo	++	++	++	++	++
Cerebelo	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Óbex	-	-	-	-	-
M. cervical	NC	-	NC	-	-
M. torácica	NC	-	NC	-	-
M. lombar	NC	-	NC	-	-
Gâng. trig.	-	-	-	-	-
Tireoide	NC	+++	+++	+++	+++
Gld subm	NC	NC	NC	NC	(+)
Adrenal	NC	NC	NC	NC	(+)
Baço	++	++	+	+	++
Tonsila	NC	++	NC	++	++
LN mesent.	+++	+++	+++	+++	+++
LN mediast	NC	NC	NC	NC	+++
LN subm.	NC	NC	NC	NC	+++
LN hepát.	NC	NC	NC	NC	+++
Timo	NC	+	(+)	++	++
Traqueia	NC	NC	NC	+	+
Língua	NC	+	+	+	+
Pulmão	+	+	+	+	+
Esôfago	NC	(+)	(+)	(+)	(+)
Rúmen	+	+	+	+	+
Retículo	+	+	+	+	+
Omaso	+	+	+	+	+
Abomaso	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Duodeno	++	NC	NC	++	++
Jejuno	++	++	++	++	++
Íleo	++	++	++	++	++
Ceco	++	NC	NC	+	+
Cólon esp.	+	NC	NC	+	+
Reto	+	NC	NC	(+)	+
<i>R. mirabile</i>	-	-	-	-	-
Rim	++	+++	++	++	+++
Ducto def.	NC	NC	NC	NC	+++
Med. óssea	NC	NC	NC	-	-

NC = não coletado, - ausência de marcação, (+) marcação imuno-histoquímica discreta, + marcação imuno-histoquímica leve, ++ marcação imuno-histoquímica moderada, +++ marcação imuno-histoquímica acentuada, C. frontal = córtex frontal, M. cervical = medula cervical, M. torácica = medula torácica, M. lombar = medula lombar, Gâng. trig. = gânglio trigeminal, Gld. Subm = glândula submandibular, LN mesent. = linfonodo mesentérico, LN mediast. = linfonodo mediastínico, LN subm. = linfonodo submandibular, LN hepát. = linfonodo hepático, Cólon esp. = cólon espiral, *R. mirabile* = *Rete mirabile*, Duct. Def. = ducto deferente, Med. óssea = medula óssea.

A identificação do vírus no olho ocorreu na membrana externa limitante, em células da camada nuclear interna e nas células ganglionares da retina, havendo também, marcação no epitélio escamoso da córnea, nas fibras nervosas da *lamina cribrosa* da esclera e em fibras do nervo óptico.

Nos órgãos linfóides, o antígeno encontrava-se predominantemente em histiócitos, linfócitos na região cortical do timo e nos cordões medulares dos linfonodos.

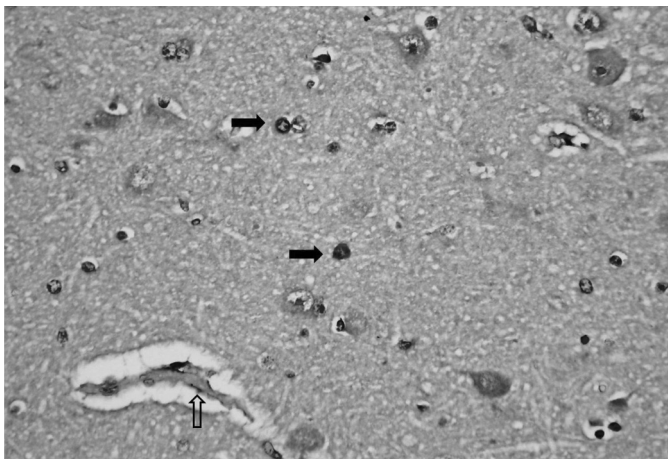


Fig.4. Bovino 4, tálamo. Marcação vermelha acentuada no citoplasma de neurônios, com marcação ocasional de astrócitos (seta cheias) e células endoteliais (seta vazia). Anticorpo monoclonal 15C5 Syracuse 1:500. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-fosfatase alcalina e contracorada com hematoxilina, obj.40x.

No aparelho digestivo, as células marcadas consistiram de células basais do epitélio e em células mononucleares da submucosa da língua, esôfago, rúmen, retículo e omaso. Observou-se ainda, discreta marcação na camada basal das células parietais do abomaso. A marcação do intestino ocorreu principalmente em histiócitos dos tecidos linfóides agregados e em células mononucleares da lâmina própria.

No sistema respiratório, em células do epitélio da traqueia, brônquios e bronquíolos, além de ocasionais marcações em histiócitos nos tecido linfóides agregados a brônquios e bronquíolos, e em células epiteliais descamadas. Marcação menos consistente foi observada em pneumócitos tipo II.

A marcação da pele incluía os queratinócitos da epiderme, células mononucleares da derme e o epitélio dos folículos pilosos (Fig.5).

Outras estruturas positivas foram rim, ducto deferente e tireoide. No primeiro identificou-se marcação multifocal

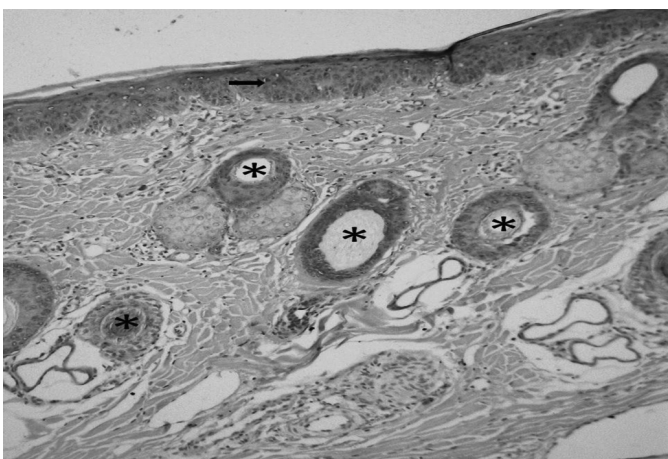


Fig.5. Bovino 4, orelha. Marcação vermelhada difusa em queratinócitos da epiderme (seta), folículos pilosos (asterisco) e em células dendríticas da derme. Anticorpo monoclonal 15C5 Syracuse 1:500. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-fosfatase alcalina e contracorada com hematoxilina, obj.20x.

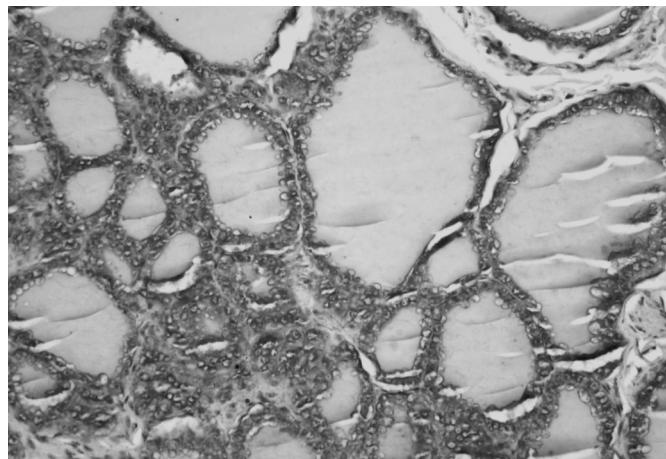


Fig.6. Bovino 5, tireoide. Marcação vermelhada difusa do epitélio folicular. Anticorpo monoclonal 15C5 Syracuse 1:500. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-fosfatase alcalina e contracorada com hematoxilina, obj.40x.

em túbulos renais e difusa na pelve. No segundo, as células epiteliais estavam fortemente marcadas. Já na tireoide havia acentuada marcação nas células foliculares (Fig.6).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar das diferentes manifestações clínicas e patológicas identificadas nos bovinos PIs estudados, no presente trabalho também foram observadas algumas semelhanças relacionadas principalmente à histologia e distribuição de antígenos do vírus nos tecidos.

A ocorrência de dermatite interdigital acompanhada de formações de crostas nas narinas, com secreção ocular e nasal, é descrita por alguns autores como consequência da infecção persistente pelo BVDV (Evermann & Barrington 2005, Schmitz 2006, Ferreira et al. 2008). Apesar da semelhança entre as lesões macroscópicas e histológicas com estes relatos, o caso observado no presente estudo não estava associado à superinfecção por amostra homóloga citopática, ou seja, não se tratava de um caso de Doença das Mucosas (DM) (Ridpath & Flores 2007). As lesões de pele encontradas neste caso podem ser consequência da replicação viral em células epiteliais, pelas quais o vírus apresenta grande tropismo (Liebler-Tenorio et al. 2003).

A babesiose cerebral diagnosticada no Bovino 2 e as mortes naturais dos outros PI podem estar correlacionadas à imunodepressão induzida pelo BVDV nestes animais, já que a maioria dos animais PI morre nos primeiros meses de vida por infecções secundárias ou pela DM (Ridpath & Flores 2007).

Os parâmetros normais observados no leucograma realizado em 3 bovinos devem ser interpretados com ressalva. Kapil et al. (2005) constataram que em infecções persistentes por BVDV, diferentemente do que ocorre na infecção aguda, a imunodepressão é induzida principalmente por alterações nas funções de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, mesmo que não haja diminuição na população linfóide circulante.

A opacidade de cristalino congênita em animais infectados pelo BVDV já foi descrita por outros autores (Scott et al. 1973, Evermann & Barrington 2005, Grooms 2006) e, pos-

sivelmente, está associada à infecção do feto entre os 100 e 150 dias de gestação, ou seja, na fase final da organogênese (Evermann & Barrington 2005). A marcação positiva pela IHQ na retina, esclera, córnea e nervo óptico indicou a presença de antígenos virais nestes tecidos, embora não tenha sido possível confirmar que o vírus tenha causado estas alterações *in utero*. A observação de lesões degenerativas no cristalino foi semelhante ao descrito por Ushigusa et al. (2000) em um estudo patológico das desordens oculares de bovinos no Japão. Neste estudo, tais alterações foram relacionadas à possível infecção congênita por vírus teratogênicos como o BVDV, Akabane e Aino, ou a genes autossômicos recessivos ou ainda a distúrbios nutricionais. Dentre as causas virais, o BVDV foi a única relatada como causa de malformações no Brasil (Schmitz 2006, Pavarini et al. 2008), entretanto, outras possíveis causas de catarata congênita deveriam ser investigadas.

Os achados de necropsia observados nos cinco animais PI foram aumento de linfonodos mesentéricos e evidência das placas de Peyer no intestino delgado. Tais achados, assim como pontos brancos na superfície cortical são semelhantes aos encontrados por Liebler-Tenorio et al. (2003) em estudo experimental com uma cepa de BVDV-2 não citopática de baixa virulência. Úlceras na cavidade oral, como as observadas em dois animais, também já foram citadas como lesões macroscópicas encontradas em animais PI (Shin & Acland 2001).

No exame histopatológico e imuno-histoquímico desses animais PI as principais alterações e marcações encontradas também já haviam sido feitas por outros autores (Liebler-Tenorio et al. 2003, Schmitz 2006). O vírus foi detectado, predominantemente, em células linfoides e epiteliais de diversos órgãos, como descrito por Shin & Acland (2001). Também como havia sido observado por Liebler-Tenorio (2005), não houve correlação entre a quantidade de antígeno viral e o local das lesões histológicas. A marcação em folículos pilosos, células dendríticas e em queratinócitos da epiderme encontrada na pele e orelha dos animais deste trabalho são características dos animais PI (Njaa et al. 2000, Brodersen 2004, Schmitz 2006).

O neurotropismo do BVDV pôde ser observado na marcação antigênica no citoplasma de neurônios do sistema nervoso central, com predileção pelo córtex cerebral e hipocampo, e na marcação de neurônios de Golgi da camada granular do cerebelo, como havia sido descrito por Hewicker et al. (1990). Adicionalmente, no presente trabalho verificou-se também marcação leve de células da glia e em células endoteliais dos capilares, semelhante ao encontrado por Schmitz (2006).

O epitélio folicular da tireoide apresentou marcação positiva acentuada nos quatro animais em que este tecido foi analisado. De acordo com Larsson et al. (1995), a replicação viral nas células foliculares de tireoide pode interferir na síntese e secreção dos hormônios tireoidianos, causando retardo no crescimento destes animais quando comparados a animais não PI.

As marcações acentuadas, predominantes em histiócitos e em alguns linfócitos nos sinusoides e região centro-folicular dos linfonodos, além da cortical do timo, também

foram demonstradas por Liebler-Tenorio et al. (2003), confirmando a predileção do vírus por células do tecido linfóide.

O reconhecimento do antígeno no citoplasma de células infectadas pela técnica de IHQ possibilitou um diagnóstico mais específico do que técnicas que necessitam da extração do antígeno de soluções (Sandvik 1999). Além disso, a IHQ pode ser utilizada em animais jovens, por não sofrer a interferência de anticorpos maternos, como ocorre em outros testes imunoenzimáticos usados para pesquisa de antígeno, como o ELISA de captura (Haines et al. 1992) ou exames sorológicos (Grooms & Keilen 2002).

Por sua vez, o isolamento viral em cultivo de células e a amplificação de RNA viral permitiram a confirmação dos resultados obtidos na IHQ. O isolamento viral identificou vírus não-citopáticos e a amplificação e sequenciamento de um fragmento da região 5' não traduzida permitiram caracterizar esta amostra como BVDV-2b. A presença desse genótipo viral já foi realizada no Estado do Rio Grande do Sul e em outros estados do Brasil (Canal et al. 1998, Flores et al. 2002, Cortez et al. 2006). A amostra do presente estudo possui maior homologia com uma cepa de BVDV-2b isolada a partir de baço de um feto bovino da Argentina (Jones et al. 2001) e com uma cepa de alta patogenicidade (Giessen 6) detectada em bovinos na Alemanha. Por outro lado, o isolado aqui descrito (Itapuã 08) apresentou menor homologia com outras amostras virais norte-americanas e canadenses anteriormente descritas e que são predominantemente BVDV-2a.

Bachofen et al. (2010) relacionaram a infecção por BVDV-1e com perdas prenatais e perinatais em rebanhos suíços. Lunardi et al. (2008) descreveram um surto de BVD no Brasil associado a BVDV-1b. Por outro lado, somente o tipo viral envolvido não é capaz de explicar todas as variações das formas de apresentação da doença. A imunidade do rebanho, as práticas de manejo adotadas como vacinação e reposição de ventres, bem como a localização regional e o contato com outros rebanhos também podem contribuir para a manifestação de surtos, que tendem a ser mais evidentes quando novos tipos virais são introduzidos em rebanhos não imunes (Houe et al. 2005, Grooms 2006). Vale ressaltar que a infecção prenatal é decisiva para a geração de novos animais PI no rebanho. Assim, a biossegurança das fêmeas prenhes com 40 a 100 dias de gestação pode ser o ponto mais importante para o controle de BVD em rebanhos de cria (Grooms 2004).

O BVDV é responsável por significativas perdas econômicas em diversos países (Lindberg & Houe 2005). Sendo assim, a caracterização e epidemiologia dos tipos virais existentes no Brasil são importantes para o planejamento e a implantação de medidas de diagnóstico e controle voltadas para esta realidade.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

Bachofen C., Braun U., Hilbe M., Ehrensperger F., Stalder H. & Peterhans E. 2010. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet. Microbiol.* 141(3/4):258-267.

- Brodersen B.W. 2004. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 20(1):85-93.
- Canal C.W., Strasser M., Hertig C., Masuda A. & Peterhans E. 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63:85-97.
- Cortez A., Heinemann M.B., De Castro A.M.M.G., Soares R.M., Pinto A.M.V., Alfieri A.A., Flores E.F., Leite R.C. & Richtzenhain L.J. 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pes. Vet. Bras.* 26:211-216.
- Evermann J.F. & Barrington G.M. 2005. Clinical Features, p.105-129. In: Goyal S.M. & Ridpath J.F. (Eds), *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control.* Blackwell Publishing, Iowa.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
- Ferreira L.C.L., Flores E.F., Driemeier D., Melo O. & Lemos R.A.A. 2008. Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 28(6):285-292.
- Flores E.F., Gil L.H.V.G., Botton A.S., Weiblen R., Ridpath J.F., Kreutz L.C., Pilati C., Driemeier D., Moojen V. & Wendelstein A.C. 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.* 77:175-183.
- Flores E.F., Ridpath J., Vogel F.S.F., Weiblen R. & Gil L.H.V.G. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Vet. Res.* 87:51-60.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehe P.M., Alfieri A.A. & Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25(3):125-134.
- Fulton R.W., Ridpath J.F., Ore S., Confer A.W., Saliki J.T., Burge L.J. & Payton M.E. 2005. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, e 2a subgenotypes. *Vet. Microbiol.* 111(1/2):35-40.
- Fulton R.W., Saliki J.T., Confer A.W., Burge L.J., d'Offay J.M., Helman R.G., Bolin S.R., Ridpath J.F. & Payton M.E. 2000. Bovine viral diarrhoea cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: Clinical and necropsy samples from cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(1):33-38.
- Fulton R.W., Whitley E.M., Johnson B.J., Ridpath J.F., Kapil S., Burge L.J., Cook B.J. & Confer A.W. 2009. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can. J. Vet. Res.* 73(4):283-291.
- Goens S.D. 2002. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Can. Vet. J.* 43(12):946-954.
- Grooms D.L. & Keilen E.D. 2002. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(4):898-900.
- Grooms D.L. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 20:5-19.
- Grooms D.L. 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriog.* 66(3):624-628.
- Haines D.M., Clark E.G. & Dubovi E.J. 1992. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Pathol.* 29:27-32.
- Hewicker M., Wöhrmann T., Fernandez A., Trautwein G., Liess B. & Moening V. 1990. Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 23(1/4): 203-210.
- Houe H., Lindeberg A. & Moening V. 2005. BVD control in Europe: Current status and perspectives. *Anim. Health. Res. Rev.* 6(1):63-74.
- Jones L.R., Zandomeni R. & Weber E.L. 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet. Microbiol.* 81:367-375.
- Kapil S., Walz P.H., Wilkerson M. & Minocha H. 2005. Immunity and immunosuppression, p.157-170. In: Goyal S.M. & Ridpath, J.F. (Eds), *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control.* Blackwell Publishing, Iowa.
- Larsson B., Traven M., Hard A.F., Segerstad C. & Belak K. 1995. Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transient or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 58:186-89.
- Liebler-Tenorio E.M. 2005. Classification and molecular biology, p. 121-144. In: Goyal S.M. & Ridpath J.F. (Eds), *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control.* Blackwell Publishing, Iowa.
- Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F. & Neil J.D. 2003. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(3):221-232.
- Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F. & Neil J.D. 2004. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16(5):388-396.
- McClurkin A.W., Littledike E.T., Cutlip R.C., Frank G.H., Coria M.F. & Bolin S.R. 1984. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Comp. Med.* 48:156-161.
- Njaa B.L., Clark E.G., Janzen E., Ellis J.A. & Haines D.M. 2000. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(5):393-399.
- Pavarini S.P., Sonne L., Antoniassi N.A.B., Santos A.S., Pescador C.A., Corbellini L.G. & Driemeier D. 2008. Anomalias congênicas em fetos bovinos abortados no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 28(3):149-154.
- Ridpath J.F. & Flores E.F. 2007. *Flaviviridae*, p.563-592. In: Flores E.F. (Ed.), *Virologia Veterinária*, UFSM, Santa Maria.
- Ridpath J.F. 2005. Classification and molecular biology, p.65-80. In: Goyal S.M. & Ridpath J.F. (Eds), *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control.* Blackwell Publishing, Iowa.
- Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406-425.
- Saliki J.T. & Dubovi E.J. 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 20:69-83.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sandvik T. 1999. Laboratory diagnostic investigation for bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Vet. Microbiol.* 64(2/3):123-134.
- Schmitz M. 2006. Caracterização patológica e imunistoquímica da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 63p.
- Scott F.W., Kahrs R.F., de Lahunta A., Brown T.T., McEntee K. & Gillespie J.H. 1973. Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Cornell Vet.* 63(4):536-560.
- Shin T. & Acland H. 2001. Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *J. Vet. Sci.* 2(2):81-84.
- Tajima M. & Dubovi E.J. 2005. Genetic and clinical analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(1):10-15.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8):1596-1599.
- Ushigusa T., Uchida K., Murakami T., Yamaguchi R. & Tateyama S. 2000. A pathologic study on ocular disorders in calves in southern Kyushu, Jpn. *J. Vet. Med. Sci.* 62(2):147-152.
- Van Campen H. 2010. Epidemiology and control of BVD in the U.S. *Vet. Microbiol.* 142(1/2):94-98.
- Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P. & Paton D.J. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136(3/4):309-323.
- Vilcek S., Paton D.J., Durkovic B., Strojny L., Iбата G., Moussa A., Loitsch A., Rossmanith W., Veja S., Scicluna M.T. & Palfi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 46:99-115.