

## Detecção do vírus 'HoBi'-like (BVDV-3) em bovino no semiárido do Estado da Paraíba<sup>1</sup>

Ana L.A. Marques<sup>2</sup>, Lisanka A. Maia<sup>2</sup>, Gildeni M.N. Aguiar<sup>2</sup>, Matheus N. Weber<sup>3</sup>, Sara V.D. Simões<sup>2</sup> e Sérgio S. Azevedo<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT-** Marques A.L.A., Maia L.A., Aguiar G.M.N., Weber M.N., Simões S.V.D. & Azevedo S.S. 2016. [Detection of 'HoBi'-like (BVDV-3) vírus in a cow in the semiarid of Paraíba, Northeastern Brazil.] Detecção do vírus 'HoBi'-like (BVDV-3) em bovino no semiárido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(11):1081-1086. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: [sergio@vps.fmvz.usp.br](mailto:sergio@vps.fmvz.usp.br)

The aim of this study was to describe the clinical and anatomopathological aspects, and the viral identification of a case of 'Hobi'-like (BVDV-3) vírus infection in cattle from the semiarid of Paraíba State, Northeastern Brazil. A female bovine, three months old, was sent to the UFCG's Veterinary Hospital presenting salivation, difficulty of ceiling seizure, lack of appetite, dark feces and in small amounts. Due to worsening of symptoms it was decided to *in extremis* euthanasia, followed by the necropsy and collection of material for histopathology. Histologically, in the mucous membranes of the digestive tract there were edema, ballooning degeneration, necrosis and inflammatory infiltrate, which was observed on the dorsal surface of the tongue and in its deepest epithelium. The immunohistochemical of skin biopsies of the extremity of the ear (ear notches) showed positive antigenic marking and by RT-PCR it was possible to detect viral RNA of BVDV in the serum, whose cytopathic effect in epithelial cells of bovine kidney lineage "Madin Darby bovine kidney" (MDBK) was not observed. The sequencing of the 5'NCR gene showed that the virus isolated was more related to 'Hobi'-like (BVDV-3). After confirming the diagnosis serum samples were collected from 23 animals for serology by indirect ELISA, and a seropositivity of 69.6% (16/23) was found. The identification of this new case of 'Hobi'-like infection in Paraíba reaffirms the need for regular BVDV monitoring in the region to early detection of infection in the herds and adoption of effective preventive and control measures.

INDEX TERMS: Cattle, BVDV-3, pestivirus, viral identification.

**RESUMO.-** Objetivou-se descrever os aspectos clínicos e anatomopatológicos, e a identificação viral de um caso de infecção pelo vírus 'Hobi'-like (BVDV-3) em bovino do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. Um bovino, fêmea, três meses de idade, foi levado ao Hospital Veterinário da UFCG apresentando salivação, dificuldade de apreensão do

teto, falta de apetite, fezes escuras e em pouca quantidade. Diante da piora do quadro clínico optou-se por sua eutanásia *in extremis*, seguida da realização da necropsia e coleta de material para histopatologia. Histologicamente, nas mucosas do trato digestivo, havia edema, degeneração balonosa, necrose e infiltrado inflamatório, que foi observado na face dorsal da língua e no seu epitélio mais profundo. A imunohistoquímica de amostras de extremidade de pavilhão auricular demonstrou marcação antigênica positiva e pela RT-PCR foi possível detectar RNA viral do BVDV no soro sanguíneo, cujo efeito citopático em células epiteliais de rim bovino da linhagem "Madin Darby bovine kidney" (MDBK) não foi observado. O sequenciamento do gene 5'NCR demonstrou que o vírus isolado estaria mais relacionado ao 'Hobi'-like (BVDV-3). Após a confirmação do diagnóstico foram coletadas amostras de soro dos 23 animais do rebanho

<sup>1</sup> Recebido em 24 de julho de 2015.

Aceito para publicação em 28 de julho de 2016.

<sup>2</sup> Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mails: [analuisa\\_vet@hotmail.com](mailto:analuisa_vet@hotmail.com), [lisankavet@hotmail.com](mailto:lisankavet@hotmail.com), [gil\\_mev@yahoo.com.br](mailto:gil_mev@yahoo.com.br), [saravdsimoes@gmail.com](mailto:saravdsimoes@gmail.com); Autor para correspondência: [sergio@vps.fmvz.usp.br](mailto:sergio@vps.fmvz.usp.br)

<sup>3</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. E-mail: [matheusnweber@gmail.com](mailto:matheusnweber@gmail.com)

para sorologia por ELISA indireto, sendo constatada 69,6% (16/23) de soropositividade. A identificação deste novo caso de infecção por 'Hobi'-like na Paraíba reafirma a necessidade de um monitoramento regular para BVDV na região para detecção precoce da infecção dos rebanhos e adoção de medidas eficazes de prevenção e controle.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovino, BVDV-3, pestivirus, identificação viral.

## INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, o qual apresenta quatro espécies antigênicamente relacionadas: o vírus da Peste Suína Clássica; vírus da Doença das Fronteiras, que acomete ovinos; e BVDV-1 e BVDV-2, cujos hospedeiros naturais são os bovinos, mas pode infectar outros ruminantes domésticos e selvagens, incluindo búfalos e veados (Becher et al. 1999, Uttenthal et al. 2005). Apesar de ainda não reconhecidas oficialmente, algumas espécies foram inseridas no gênero *Pestivirus* a partir da semelhança entre suas regiões genômicas. Acredita-se que a natureza de fita simples do gênero favoreça as altas taxas de mutações que são observadas, sendo possível a emergência destas novas linhagens (Bauermann et al. 2013).

Há três grupos recentemente identificados, e dentre eles está o grupo dos pestivirus atípicos que estão estritamente relacionados e inicialmente foram isolados a partir de amostras de soro fetal bovino (Schirrneier et al. 2004). Incluem-se neste grupo o D32/00\_'HoBi' (Schirrneier et al. 2004) e Brz buf 9 (Stalder et al. 2005), ambos provenientes do Brasil; o CH-KaHo/cont da América do Sul (Stalder et al. 2005) e o Th/04\_Khon-Kaen da Tailândia (Ståhl et al. 2007). A partir do primeiro isolado do grupo, o D32/00\_'HoBi' foi denominado vírus 'Hobi'-like, referido por alguns autores como BVDV-3 (Liu et al. 2009) pela apresentação clínica semelhante à dos BVDVs já reconhecidos (Bauermann et al. 2013).

A diarreia viral bovina (BVD) apresenta-se geralmente de forma subclínica, contudo pode causar distúrbios respiratórios, digestivos, reprodutivos e/ou hemorrágicos (Baker 1995, Ridpath 2010). O BVDV tem a habilidade de causar dois tipos de infecções no hospedeiro, as transitórias e as persistentes, o que garante seu sucesso e permanência nos rebanhos. A infecção transitória pode ser causada por vírus cp (citopático) ou ncp (não citopático) e acomete animais imunocompetentes, induzindo-os a uma resposta imune capaz de debelar a infecção, tornando-a auto limitante (Houe 1999). Já a persistente ocorre em fetos que estão entre 40 e 125 dias de gestação, quando as vacas prenhes e não imunes ao BVDV se infectam. O vírus, especificamente ncp, atravessa a placenta e entra em contato com o feto, que ainda não possui seu sistema imune suficientemente desenvolvido, reconhecendo erroneamente as proteínas virais como próprias e desenvolvendo imunotolerância específica. Esses animais são conhecidos como persistentemente infectados (PI), os quais apesar de soronegativos eliminam o vírus por secreções e excreções durante toda a vida (Baker 1995, Grooms 2004, Ridpath 2010).

Em novembro de 2011, uma afecção caracterizada por sinais respiratórios e digestivos graves, não responsiva a tratamento, com curso clínico de 15 a 20 dias acometeu bezerros no sertão da Paraíba, causando mortalidade superior a 10%. Na propriedade havia ainda histórico de doença reprodutiva caracterizada por aborto e repetição de cio. Foi possível diagnosticar a presença de anticorpos contra o BVDV no rebanho e isolar em quatro animais estirpes semelhantes ao vírus 'Hobi'-like (Weber et al. 2014). A crescente identificação de pestivirus atípicos em pelo menos três continentes tem suscitado grande preocupação de técnicos e pesquisadores em sanidade animal, pois tais agentes são recentes e suas epidemiologia, biologia e patogenia ainda são pouco conhecidas (Ridpath 2010, Ståhl & Alenius 2012). Diante de poucas informações acerca desta nova espécie de BVDV identificado e de sua ocorrência natural, é importante relatar surtos e casos esporádicos onde sinais clínicos e patológicos contribuam para a caracterização deste vírus emergente. No presente trabalho, são descritos os aspectos clínicos, anátomo-patológicos e identificação viral de um caso de infecção pelo vírus 'Hobi'-like em bovino do semiárido da Paraíba.

## MATERIAL E MÉTODOS

**História clínica e coleta de amostras.** Em outubro de 2012, um bovino fêmeo, três meses de idade e proveniente de propriedade rural do município de Patos, Paraíba, foi encaminhado ao Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) com histórico de que há 15 dias apresentava salivacção, dificuldade de apreensão do teto, falta de apetite, fezes escuras e em pouca quantidade. O animal havia apresentado há um mês episódio de diarreia quando então foi vermifugado com melhora clínica. Todos os animais da propriedade estavam sadios e não havia histórico de doença recente, exceto o caso relatado. Todos eram vacinados apenas contra Febre Aftosa. Foi colhido sangue total para hemograma e pesquisa de hemoparasitos e fezes para exame parasitológico. Foram colhidas amostras para biopsia da extremidade dos pavilhões auriculares do animal, de aproximadamente 1cm de comprimento e 0,5cm de largura, que foram acondicionadas em tubos contendo solução de formol a 10% por 24 horas, com posterior desidratação em soluções crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em parafina para imunohistoquímica (IHQ). Adicionalmente coletou-se o soro do animal que foi centrifugado e armazenado em freezer a -70°C para o RT-PCR e isolamento viral. O animal permaneceu interno por 16 dias, porém, diante da piora do quadro clínico optou-se por sua eutanásia *in extremis*, onde foram coletados fragmentos de todos os órgãos e processados de acordo com as técnicas de rotina histopatológica. Após a confirmação do diagnóstico foram colhidas amostras de soro de todos os animais do rebanho para realização da sorologia para BVDV.

**Imuno-histoquímica.** A IHQ foi realizada no Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) a partir das amostras do pavilhão auricular. O anticorpo primário monoclonal comercial anti-BVDV #15c-5 (Syracuse Bioanalytical Inc., USA), que se liga especificamente à proteína Erns dos pestivirus, foi diluído 1:500 em PBS. A recuperação antigênica foi feita com protease XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co., USA) 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 100µL da solução do cromógeno Permanent Red (DakoCytomation) que foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. Fez-se contra coloração 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 biópsia de orelha foram inseridas em série com as lâminas a serem testadas. Para os controles negativos, substituiu-se o anticorpo primário por PBS (Santos et al. 2011).

**RT-PCR.** O RNA total foi extraído da amostra de soro do animal utilizando o TRIzol™ LS Reagent (Life Technologies, USA) e suspenso em 50µL de água ultrapura, de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram sintetizados utilizando o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Life Technologies, USA), em volume total de 20µL. A PCR foi preparada em volume total de 25µL que continha 2µL de cDNA, usando dois protocolos para amplificar fragmentos do gene 5'NCR, com o emprego dos primers 324 5'- ATGCCCWGTAGGACTAGCA-30 (posição na cepa de BVDV-1 NADL: 108-128) e 326 5'- TCAACTCCATGTGCCATGTAC-30 (posição na cepa NADL: 395-375), que amplificam um fragmento de 288bp (Vilcek et al. 1994), e 5'- CATGCCCRYAGTAGGACTAGC-30 (posição na cepa NADL: 107-127) e 5'-ATGTGCCATGTACAGCAGAG-30 (posição na cepa NADL: 387-368), que amplificam um fragmento de 280bp (Deregt et al. 2006). Os produtos da amplificação foram marcados com Blue Green® Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil) e eletroforese em gel de agarose a 2%. Como controle positivo foi utilizado a cepa BVDV-1 NADL. Para o sequenciamento do DNA, sequências parciais de 5'NCR (Deregt et al. 2006), foram amplificadas por RT-PCR.

**Isolamento viral.** O soro positivo no RT-PCR foi inoculado em 25cm<sup>2</sup> de células epiteliais de rim bovino da linhagem "Madin Darby bovine kidney" (MDBK) mantidas em meio Eagle modificado "Dulbecco's modified Eagle medium" (DMEM) suplementadas com 5% de soro fetal bovino (FCS) livre de BVDV e de anticorpos anti-BVDV, antibióticos (200 IU/ml de penicilina e 200mg/ml de estreptomina) e incubado a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 4 dias. A presença de pestivirus não-citopático foi monitorada por ensaio em monocamada de imunoperoxidase usando anti-NS2/3 monoclonal após terceira passagem.

**Purificação, sequenciamento e análise filogenética dos produtos de amplificação.** Os fragmentos de 5'NCR amplificados na RT-PCR foram purificados utilizando o kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Germany). As cadeias de DNA foram sequenciadas a partir da RT-PCR com analisador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, utilizando kit de sequenciamento de ciclo BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). As sequências parciais foram montadas usando SegMan (DNASTAR Lasergene® 11, Madison, Wisconsin, USA). O alinhamento das sequências foi realizado com o Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5 (MEGA 5) (Tamura et al. 2011) usando CLUSTAL W. As sequências dos iniciadores foram excisadas e as sequências resultantes submetidas ao GenBank usando BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para confirmação de sua identidade. Para análise filogenética, o alinhamento foi realizado com o uso do nucleotídeo 189 (5'NCR) dos produtos da RT-PCR e 16 cepas de referência. O software MEGA 5 foi utilizado para a inferência filogenética de acordo com o critério *neighbor-joining* e modelo Kimura de 2 parâmetros.

**Sorologia.** A sorologia foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Campina Grande, onde os soros foram individualmente submetidos ao teste de ELISA indireto IDEXX BVDV p80 Ab Test (IDEXX Montellier SAS, France)

para detecção de anticorpos contra BVDV. As amostras foram processadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando-se placas de poliestireno de 96 poços e leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm (A<sub>450</sub>). Os resultados foram calculados a partir da porcentagem de inibição de acordo com a seguinte fórmula: A/N = 100 x (Amostra A450/ CNx), onde A/N é a relação da amostra, Amostra A450 é a amostra a ser avaliada e CNx é a média do controle negativo. O resultado obtido foi interpretado da seguinte forma: amostras com relação A/N superior ou equivalente a 50% foram consideradas negativas; amostras com relação A/N inferior ou equivalente a 40% foram consideradas positivas; e amostras com relação A/N entre 40 e 50% foram consideradas suspeitas.

## RESULTADOS

A partir do exame físico observou-se apatia, estado nutricional magro, anorexia, bruxismo, mucosas congestas, hipertrofia dos linfonodos pré-escapulares, úlceras na cavidade oral, glossite com lesões de coloração amarelada, secreção nasal bilateral purulenta e feridas com crostas no espelho nasal, fezes pastosas em pequena quantidade, com muco, escuras e fétidas, além de tenesmo e desidratação de 8%. Dos exames laboratoriais, houve apenas alteração no hemograma, que revelou hemoconcentração e aumento no valor do hematócrito e proteína total.

Na necropsia observou-se espessamento difuso e acentuado da superfície dorsal da língua por material branco amarelado, friável e granular que se desprendia facilmente (Fig.1A). O mesmo material foi visto aderido à porção inicial do retículo e nas folhas do omaso, causando espessamento dos favos de mel e folhas. No esôfago havia áreas multifocais ulceradas com superfície avermelhada e outras áreas erosivas com superfície esbranquiçada, elevada e irregular. Lesões macroscópicas não foram observadas em outros órgãos.

Microscopicamente as lesões caracterizaram-se por formações vesículo pustulares erosivas e ulcerativas observadas no epitélio da língua, esôfago, rumen, retículo e omaso. Na face dorsal da língua observou-se glossite necrosuprativa e erosiva associada à degeneração balonosa e pústulas. O epitélio superficial estava acentuadamente necrótico, formando camadas, e entre elas havia formação de vesículas e pústulas (Fig.1B). No epitélio mais profundo observou-se moderada hiperplasia, degeneração balonosa e necrose individual de queratinócitos. Na submucosa havia infiltrado inflamatório mononuclear discreto situado principalmente ao redor de vasos. Lesões erosivas semelhantes também foram observadas na mucosa do rumen, retículo e omaso. No esôfago as lesões foram predominantemente ulcerativas, com áreas multifocais de necrose do epitélio da mucosa associada a fibrina e agregados bacterianos. Nas áreas adjacentes havia erosões e formação de cavitação, com separação e desprendimento do epitélio da mucosa.

A IHQ demonstrou marcação antigênica positiva dos queratinócitos. Na RT-PCR foi possível detectar RNA viral de BVDV no soro sanguíneo. O isolamento viral foi realizado a partir deste soro positivo na RT-PCR, cujo efeito citopático não foi observado. A árvore filogenética obtida (Fig.2) demonstra seis *clusters* separados que correspondem aos pestivirus BVDV-1, BVDV-2, CSFV, BDV, vírus Pronghorn antelope e 'Hobi'-like. A amostra detectada no presente estudo

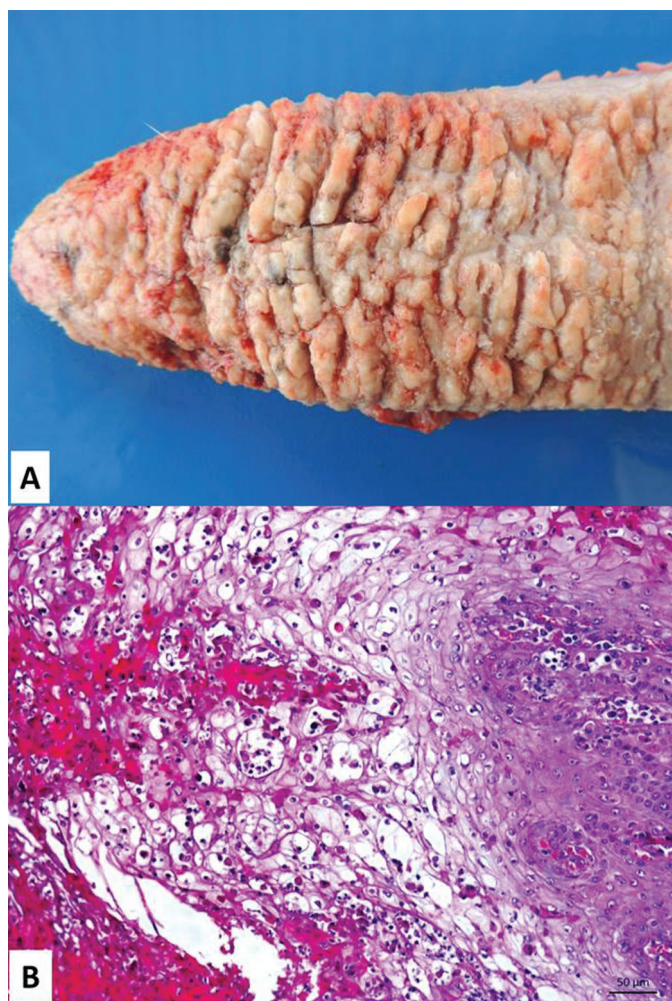


Fig.1. Bovino fêmea, 3 meses de idade, positivo para BVDV-3. (A). Espessamento difuso e acentuado da superfície dorsal da língua por material branco amarelado, friável e granular. (B). Observa-se no epitélio superficial da língua degeneração balonosa e formação de vesículas e pústulas. HE, barra = 50µm.

apresentou 99% de identidade com as cepas D32/00\_HoBi (Número de acesso no GenBank: KP715144.1), detectada como contaminante de soro fetal bovino de origem brasileira (Schirrmeier et al. 2004) e LV04/12 HoBi (Número de acesso no GenBank: KC465391.1), detectada em bovino com sintomatologia semelhante a doença das mucosas em Pombal, Paraíba, Brasil (Weber et al. 2014). Portanto, a amostra viral detectada no presente estudo (denominada PB22487/12) está mais relacionada com o vírus 'Hobi'-like. O levantamento sorológico da propriedade revelou que 69,6% (16/23) dos animais foram soropositivos para o BVDV.

## DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados são determinados diretamente pela replicação viral ou por infecções secundárias decorrentes da imunodeficiência induzida por ele (Potgieter 1995), e neste animal acometeu principalmente o trato digestivo. Alguns autores afirmam que o BVDV-3, em infecções naturais e experimentais, também está relacionado a síndromes respiratórias (Decaro et al. 2011, 2012b, Larska et al. 2012),

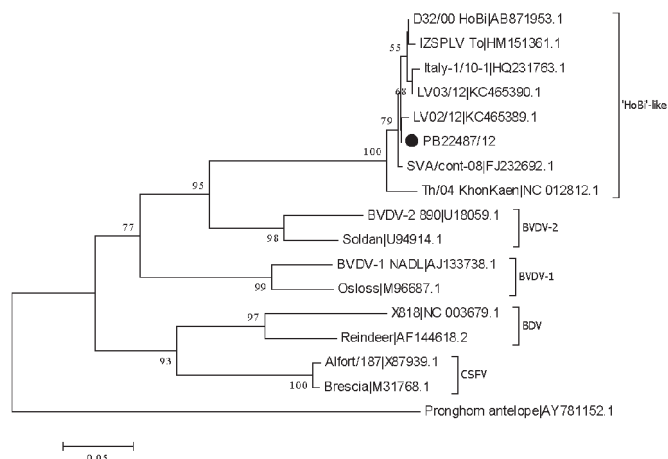


Fig.2. Árvore filogenética retangular baseada nos fragmentos das sequências de nucleotídeos do gene 5'NCR de membros do gênero *Pestivirus*. Amostra PB22487/12 está destacada com um símbolo (•).

abortos (Cortez et al. 2006, Bianchi et al. 2011, Decaro et al. 2012a) e episódios de piroxia sem outras manifestações clínicas (Ridpath et al. 2013), de maneira que estas afecções são clinicamente semelhantes àquelas causadas pelo BVDV-1 e BVDV-2 (Decaro et al. 2013, Weber et al. 2014).

As alterações hematológicas foram conseqüentes à desidratação do animal, que apresentou policitemia pela redução do volume plasmático. Geralmente o consumo hídrico de animais enfermos é inadequado para manter o conteúdo de água corporal normal, resultando em hemoconcentração, que aumenta o hematócrito e a proteína plasmática total (Lopes et al. 2007). Decaro et al. (2013) observaram apenas moderada linfopenia sem encontrar outras alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de um bezerro PI por BVDV-3, enquanto Weber et al. (2014) relataram leucopenia e neutrofilia nas mesmas circunstâncias. A maioria dos bovinos infectados apresentam leucopenia transitória e neutropenia, e em infecções persistentes, diferentemente do que ocorre na infecção aguda, a imunodepressão é induzida principalmente por alterações nas funções de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, pela afinidade do vírus por células de defesa, causando sua destruição e prejuízo funcional das células sobreviventes (Potgieter 2004).

A partir do exame necroscópico pôde-se observar alterações macroscópicas que variam consideravelmente, especialmente em casos agudos, em que o trato alimentar superior e as lesões intestinais estão quase sempre presentes, no entanto, neste animal não foram observadas lesões intestinais. As úlceras e erosões por toda a mucosa do trato digestivo estão presentes em muitos bezerros afetados, bem como as crostas nas narinas e focinho, o que já foi citado como lesões macroscópicas características encontradas em animais PI. No esôfago, as erosões podem ser lineares ou irregulares, e neste caso apresentaram a superfície avermelhada, denotando hiperemia não reativa, que podem estar recobertas por epitélio necrótico ou por placas amarelo-esbranquiçadas ligeiramente elevadas de epitélio proliferativo, lesões estas semelhantes às encontradas na parede do rumen e no omaso, onde estão mais presentes

ao longo das bordas de suas folhas (Shin & Acland 2001, Flores 2003, Brown et al. 2004).

Histologicamente, nas mucosas do trato digestivo, Flores (2003) referiu edema, degeneração balonosa, necrose e infiltrado inflamatório, o que foi observado na face dorsal da língua e no seu epitélio mais profundo do animal acometido. Esse foco necrótico estende-se progressivamente e por coalescência pode formar pequenas vesículas de clivagem ao longo da junção própria do epitélio, levando a erosões e ulcerações (Brown et al. 2004). Na submucosa da língua o infiltrado inflamatório mononuclear discreto estava situado principalmente ao redor de vasos, causando vasculite, que em associação com a infecção pelo BVDV, tem sido relatada nas infecções agudas pelo BVDV-2 e também na doença das mucosas, cujas lesões podem ser causadas pelo depósito de imunocomplexos nas paredes vasculares devido ao aumento nos títulos de anticorpos (Odeon et al. 1999, Liebler-Tenorio et al. 2003).

Para alguns autores, somente o tipo viral envolvido não é capaz de explicar todas as variações das formas de apresentação da doença, sendo necessário outros fatores como a imunidade do rebanho, as práticas de manejo adotadas como a vacinação, bem como a localização regional e o contato com outros rebanhos que contribuem também para a ocorrência de surtos, que tendem a ser mais evidentes quando novos tipos virais, como o 'Hobi'-like, são introduzidos em rebanhos não imunes (Grooms 2006, Santos et al. 2011).

A característica persistente da infecção foi confirmada pela coloração imunohistoquímica de amostras de biópsia da pele, que de acordo com Grooms & Keilen (2002) é um método confiável para a triagem de bezerros PI pelo BVDV. A presença do vírus em estruturas da pele é restrita a este tipo de infecção e a IHQ pode diferenciá-la da infecção transitória ou aguda, nas quais o antígeno viral não é encontrado em estruturas epidérmicas da pele (Hilbe et al. 2007). Através do isolamento viral foi possível identificar o caráter não citopático da cepa, indicando a ausência da doença das mucosas neste animal. Decaro et al. (2013) monitorou um animal PI por BVDV-3 durante um período maior que seis meses em que este não desenvolveu a doença das mucosas, apresentando apenas a cepa não citopática, retardo do crescimento e diversas infecções secundárias durante o período do estudo devido à imunossupressão causada pelo vírus.

No presente trabalho, a alta porcentagem de bovinos soropositivos em rebanho não vacinado confirma a sua exposição ao BVDV, principalmente quando há presença de animal PI e sua identificação é tardia, o que favorece a disseminação do vírus, uma vez que há tempo da maioria dos animais entrarem em contato com o animal suspeito (Arenhart et al. 2009). Esse percentual, de acordo com Houe & Meyling (1991), pode atingir até 87% dos bovinos expostos quando há um animal PI no rebanho. Moerman et al. (1993) afirmaram haver soroconversão de todos os bovinos soronegativos do rebanho após o contato com um animal PI em um período de até três meses.

A permuta de animais não era prática comum dentro do rebanho, porém, ocasionalmente havia contato com animais vizinhos, e esse contato direto com animais agudamente infectados pode contribuir para a transmissão do

vírus, embora de maneira menos eficiente (Meyling et al. 1990). Entretanto, alguns autores afirmam que a possibilidade de transmissão a partir de animais acometidos transitoriamente é mínima em relação ao PI, uma vez que a duração da infecção e quantidade de vírus por eles excretados é bem menor (Niskanen et al. 2000, Niskanen et al. 2002). Apesar da semelhança entre a cepa viral isolada neste relato com a do surto relatado por Weber et al. (2014) em uma região próxima, o proprietário afirma que não adquiria animais provenientes daquele local.

A exposição deste rebanho a um animal PI o fez desenvolver uma resposta imunológica satisfatória pela quantidade de animais soroconvertidos e pelos mínimos prejuízos que o vírus causou ao rebanho como um todo. Segundo Brownlie (1990), após o contato com o vírus, o animal permanece soropositivo para BVDV durante toda a sua vida. Porém, para outros autores, essa soroconversão não resulta necessariamente em proteção ao longo da vida contra uma reinfecção (Lindberg et al. 2008). Neste sentido, um programa de vacinação, por exemplo, não previne todas as infecções em animais individualmente (Ridpath et al. 2013). Dezen et al. (2013) demonstraram que em um rebanho vacinado contra o BVDV e apresentando problemas reprodutivos foi possível isolar o vírus. Por esta razão a vacinação para BVDV, por si só, pode não eliminar o BVDV das populações (O'Rourke 2002, Lindberg & Houe 2005, Ridpath 2010, Ridpath et al. 2013), sendo importante apenas para reduzir a incidência de infecções agudas e persistentes em um rebanho.

## CONCLUSÕES

Através da sintomatologia clínica, alterações anatomo-patológicas, isolamento viral e sequenciamento genético, foi possível identificar uma vaca acometida pelo vírus 'Hobi'-like, contribuindo assim, para uma melhor caracterização da manifestação desse vírus emergente na região.

A identificação deste novo caso de infecção por 'Hobi'-like na Paraíba reafirma a necessidade de monitoramento regular para BVDV na região para detecção precoce da infecção dos rebanhos e adoção de medidas eficazes de prevenção e controle.

**Agradecimentos.** - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro (Processo 88881.068412/2014-01).

## REFERÊNCIAS

- Arenhart S., Bauerman F.V., Oliveira S.A.M., Weiblen R. & Flores E.F. 2009. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. *Pesq. Vet. Bras.* 29(9):736-742.
- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 11:425-445.
- Bauermann F.V., Harmon A., Flores E.F., Falkenberg S.M., Reecy J.M. & Ridpath J. F. 2013. In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhoea viruses 1 and 2. *Vet. Microbiol.* 166:242-245.
- Becher P., Orlich M., Kosmidou A., König M., Baroth M. & Thiel H-J. 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262:64-71.
- Bianchi E., Martins M., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesq. Vet. Bras.* 31:649-655.
- Brown C.C., Baker D.C. & Barker K. 2004. Alimentary system, p.140-148.

- In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Brownlie J. 1990. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 23:371-382.
- Cortez A., Heinemann M.B., 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 50-UTR region. *Pesq. Vet. Bras.* 26:211-216.
- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E. & Buonavoglia C. 2011. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1549-1552.
- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Sciarretta R., Pinto P., Buonavoglia D., Martella V. & Buonavoglia C. 2012a. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *J. Clin. Microbiol.* 50:509-512.
- Decaro N., Mari V., Pinto P., Lucente M.S., Sciarretta R., Cirone F., Colaianni M.L., Elia G. & Buonavoglia C. 2012b. Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from diseased animal. *J. Gen. Virol.* 93:1976-1983.
- Decaro N., Losurdo M., Lucente M.S., Sciarretta R., Mari V., Larocca V., Elia G., Cavaliere N., Martella V., Fasanella A. & Buonavoglia C. 2013. Persistent infection caused by HoBi-like pestivirus. *J. Clin. Microbiol.* 51:1241-1243.
- Deregt D., Gilbert S.A., Dudas S., Pasick J., Baxi S., Burton K.M. & Baxi M.K. 2006. A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses. *J. Virol. Methods* 136:17-23.
- Dezen S., Otonel R.A.A., Alfieri A.F., Lunardi M. & Alfieri A.A. 2013. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):141-147.
- Flores E.F. 2003. Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). *Biológico, São Paulo*, 65(1-2):3-9.
- Grooms D.L. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 20:5-19.
- Grooms D.L. 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 66(3):624-628.
- 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.
- Hilbe M., Arquint A., Schaller P., Zlinszky K., Braun U., Peterhans E. & Ehrensperger F. 2007. Immunohistochemical diagnosis of persistente infection with Bovine Diarrhoea Virus (BVDV) on skin biopses. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 149(8):337-344.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64:89-107.
- Houe H. & Meyling A. 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Med.* 11:9-16.
- Larska M., Polak M.P., Riitho V., Strong R., Belak S., Alenius S., Uttenthal A. & Liu L. 2012. 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. *Comp. Immunol. Microbiol.* 35:381-390.
- 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.
- Lindberg A. & Houe H. 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72:55-73.
- Lindberg A., Niskanen R. & Alenius S. 2008. Persistence of antibodies to type 1 BVDV after natural infection and fetal protection against challenge with a strain of a homologous genotype. *Proceedings of the 7th ESVV Pestivirus Symposium, Uppsala, Sweden*, p.62.
- Liu L., Xia H., Wahlberg N., Belak S. & Baule C. 2009. Phylogeny classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 385:351-357.
- Meyling A., Houe H. & Jensen A.M. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 75-93.
- Moerman A., Straver P.J., Dejong M.C.M., Quak J., Baanvinger T. & Van Oirschot J.T. 1993. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet. Rec.* 132:622- 626.
- Niskanen R., Lindberg A., Larsson B. & Alenius S. 2000. Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. *Acta Vet. Scand.* 41:93-99.
- Niskanen R., Lindberg A. & Traven M. 2002. Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. *Vet. J.* 163:251-259.
- Odeon A.C., Kelling C.L., Marshall D.J., Estela E.S., Dubovi E.J. & Donis R.O. 1999. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:221-228.
- O'Rourke K. 2002. BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220(12):1770-1773.
- Potgieter L.N.D. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 11:501-520.
- Potgieter L.N. 2004. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease, p.946-969. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Ridpath J.F. 2010. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Global Status. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 26:105-121.
- Ridpath J.F., Falkenberg S.M., Bauermann F.V., Vanderley B.L., Do Y., Flores E.F., Rodman D.M. & Neill J.D. 2013. Comparison of acute infection of calves exposed to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhoea virus or a HoBi-like virus. *Am. J. Vet. Res.* 74:438-442.
- 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. 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. *Pesq. Vet. Bras.* 31(10):885-892.
- Schirrmeier H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B. & Beer M. 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85:3647-3652.
- Shin T. & Acland H. 2001. Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *J. Vet. Sci.* 2(2):81-84.
- Ståhl K. & Alenius S. 2012. BVDV control and eradication in Europe: an update. *Jpn. J. Vet. Res.* 60:31-39.
- Ståhl K., Kampa J., Alenius S., Persson Wadman A., Baule C., Aiumlamai S. & Belák S. 2007. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus-implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.* 38:517-523.
- Stalder H.P., Meier P., Pfaffen G., Wageck-Canal C., Rüfenacht J., Schaller P., Bachofen C., Marti S., Vogt H.R. & Peterhans E. 2005. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72:37-41.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731- 2739.
- Weber M.N., Mósena A.C.S., Simões S.V.D., Almeida L.L., Pessoa C.R.M., Budaszewski R.F., Silva T.R., Ridpath J.F., Riet-Correa F., Driemeier D. & Canal C.W. 2014. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with 'HoBi'-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* doi:10.1111/tbed.12223.
- Uttenthal A., Grøndahl C., Hoyer M.J., Houe H., Van Maanen C., Rasmussen T.B. & Larsen L.E. 2005. Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves: Do we know the reservoirs for BVDV? *Prev. Vet. Med.* 72:87-91.
- 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.* 136:309-323.