NATÁLIA MEIRELLES SOBREIRA

**Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos em fêmeas
Holandesas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia
Viral Bovina (BVDV)**

São Paulo

2018

NATÁLIA MEIRELLES SOBREIRA

**Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos em fêmeas
Holandesas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia
Viral Bovina (BVDV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Viviani Gomes

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3612
FMVZ

Sobreira, Natália Meirelles

Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) / Natália Meirelles Sobreira. – 2018.
129 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Viviani Gomes.

1. Diarreia. 2. Broncopneumonia. 3. Produção de leite. 4. Hemograma. 5. Imunidade inata. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Aspectos Clínicos, Hematológicos, Imunológicos em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD)", protocolada sob o CEUA nº 5131190216, sob a responsabilidade de **Viviani Gomes e equipe; Natália Meirelles Sobreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 05/01/2017.

We certify that the proposal "Clinical, hematological and imunological findings in persistently infected Holstein heifers by Bovine Viral Diarrhea Virus ", utilizing 3700 Bovines (3700 females), protocol number CEUA 5131190216, under the responsibility of **Viviani Gomes and team; Natália Meirelles Sobreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/05/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2016](#) a [02/2018](#)

Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [1 a 120 meses](#)

N: [3700](#)

Linhagem: [Holândes](#)

Peso: [30 a 1000 kg](#)

Resumo: O objetivo geral deste trabalho consiste na avaliação dos aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos de fêmeas bovinas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina. Serão triados os animais persistentemente infectados (PI) para o Vírus da Diarreia Viral Bovina por meio de biópsia de orelha e realização de dois testes imunoenzimáticos para pesquisa de antígeno com intervalo de 30 dias entre os exames. Serão realizados os seguintes exames nos animais PI: exame clínico, hemograma, dosagem de haptoglobina e função dos neutrófilos sanguíneos.

Local do experimento: Fazenda Colorado - campo; laboratórios VCM - análises imunológicas e hematológicas; Instituto Biológico.

São Paulo, 19 de janeiro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOBREIRA, Natália Meirelles

Título: **Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos em fêmeas
Holandesas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia
Viral Bovina (BVDV)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho à Deus,
à minha família
e ao GeCria.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade e caminhos trilhados!

À minha família que sempre foi e sempre será meu porto seguro. Por nunca me deixarem desistir, obrigada pelo apoio. Aos meus pais pelo carinho, proteção, conselhos, cobranças e amor incondicional. À minha irmã pelo amor e amizade. Ao meu marido por me amar, ajudar com a estatística, ter paciência com as viagens dos experimentos, pelo convívio e por ser a principal razão deste mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Viviani Gomes pela parceria, pela oportunidade que me proporcionou ao abrir as portas da FMVZ, por me apresentar novas realidades, por acreditar e confiar no meu trabalho! Fico muito feliz que todos os trabalhos tenham uma finalidade prática e de extensão.

À toda equipe GeCria em especial aos amigos Camila Costa Baccili, Juliana F. Rei Costa, Camila Cecília Martin, Jean Silva Ramos, Fabricio Torres e Karen Nascimento da Silva, pelos ensinamentos das técnicas, estatística, ajuda antes e durante o experimento. Agradeço o carinho com que me receberam! À Profa. Dra. Karina Medici Madureira e ao Prof. Dr. David John Hurley por serem “extensões” especiais e valiosas da nossa equipe.

Gostaria de agradecer à todos da Família Colorado, pelos quais eu tenho gratidão e carinho imenso. Sem a ajuda de vocês esta dissertação não seria realizada!

Aos professores do Departamento de Clínica Médica: Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fábio Celidonio Pogliani, Profª Drª Lílian Gregory, Profª Drª Maria Cláudia Araripe Sucupira, Profª Drª Viviani Gomes, em especial ao Prof. Dr. Fernando José Benesi, pela paciência ao ensinar a diferenciação dos leucócitos e por outros ensinamentos nas disciplinas de Clínica e Neonatologia.

Aos funcionários e técnicos da FMVZ! Aos colegas pós graduandos por animarem meus dias e deixarem esta caminhada mais leve.

À Maristela Pituco e Liria Okuda por apoiarem as nossas pesquisas através das análises no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Departamento de Clínica Veterinária pela concessão da bolsa de mestrado.

Obrigada!

“Sou feita de retalhos. Pedacinhos coloridos de cada vida que passa pela minha e que vou costurando na alma. Nem sempre bonitos, nem sempre felizes, mas me acrescentam e me fazem ser quem eu sou.

Em cada encontro, em cada contato, vou ficando maior. Em cada retalho, uma vida, uma lição, um carinho, uma saudade... que me tornam mais pessoa, mais humano, mais completo.

E penso que é assim mesmo que a vida se faz: de pedaços de outras gentes que vão se tornando parte da gente também. E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados... haverá sempre um retalho novo para adicionar à alma. Portanto, obrigada a cada um de vocês, que fazem parte da minha vida e que me permitem engrandecer minha história com os retalhos deixados em mim. Que eu também possa deixar pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte das suas histórias. E que assim, de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia, um imenso bordado de nós”.

Cora Coralina

RESUMO

SOBREIRA, N. M. **Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos em fêmeas da raça Holandesa persistentemente infectadas para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV).** [Clinical, hematological and imunological findings in persistently infected Holstein heifers and cows by Bovine Viral Diarrhea Virus]. 2018. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos clínicos, a eficiência produtiva, reprodutiva, a resposta imune inata e humoral em fêmeas da raça Holandesa persistentemente infectadas (PI) com BVDV. Para tanto, foram selecionadas 25 PI's por meio do ELISA antígeno, das quais oito eram bezerras ≤ 12 meses; seis novilhas entre 13 e 24 meses; e onze animais de 25 a 36 meses de idade. O grupo não infectado (NI) foi composto por fêmeas negativas com faixas etárias pareadas às PI's. Em geral, as fêmeas PI's apresentaram maior frequência de diarreia ($P=0,012$) e Doença Respiratória Bovina (DRB) ($P=0,004$), especialmente àquelas entre 25 a 36 meses de idade. As PI's apresentaram maior concentração sérica de haptoglobina ($P=0,017$). As vacas NI's produziram mais leite (8-12 litros) do que as PI's ($P\leq 0,011$). A contagem de células somáticas (CCS) foi maior para as vacas PI's em relação NI's durante a lactação ($P\leq 0,066$). A média de CCS observada foi de $0,2-0,5 \times 10^5$ (células/mL) e $2,0-10,5 \times 10^5$ (células/mL) nos grupos PI e NI, respectivamente. A idade na primeira inseminação ($P=0,001$) e o número de inseminação necessário para a primeira prenhez foi maior para PI do que nas novilhas NI's ($P=0,051$). Na avaliação hematológica, as PI's apresentaram menores valores de hemoglobina ($P=0,098$), hematócrito ($P=0,084$), hemoglobina corpuscular média ($P=0,092$), plaquetas ($P=0,040$), plaquetócrito ($P=0,059$) e linfócitos (número absoluto $P=0,075$; relativo $P=0,092$) em relação às NI's. Em contraste, a porcentagem de monócitos foi maior em PI do que animais NI ($P=0,014$). Em geral, a proporção (%) e a intensidade da fagocitose (MFI) para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram maiores nas PI's do que animais NI ($P<0,079$). A porcentagem de células que produziram espécies reativas de oxigênio (ERO's) endógeno foi menor em PI do que animais de NI ($P=0,005$). Padrão semelhante foi observado na porcentagem de células que produziram ERO's após estímulo com

Staphylococcus aureus (P=0,000) ou *Escherichia coli* (P=0,000). Em contraste, a intensidade da produção de EROS basal foi maior nas PI's do que nas NI's (P=0,011). Um padrão semelhante foi observado para a intensidade da produção de ERO's quando as células foram estimuladas com *Staphylococcus aureus* (P=0,011) ou *Escherichia coli* (P= 0,013). Por meio da soroneutralização, observou-se que os títulos médios dos anticorpos neutralizantes para as BVDV, BRSV e BoHV foram menor no grupo PI (P=0,000). No entanto, os títulos de anticorpos para BPIV-3 foram semelhantes entre os grupos (P=0,146). A proteína sérica total (PT) foi menor nas PI em relação as NI's (P=0,021). As fêmeas PI's apresentaram maior frequência de diarreia e DRB, além da menor produção leiteira, diminuição da qualidade do leite e menor fertilidade. O leucograma demonstrou diminuição dos tipos celulares, exceto monócitos. No geral, houve resposta imune inata foi exacerbada nas fêmeas PI's, provavelmente pela menor eficiência na produção de ERO's. Em relação ao sistema imune específico observou-se linfopenia e títulos nulos ou baixos de anticorpos neutralizantes contra as viroses respiratórias.

Palavras-chave: Diarreia. Broncopneumonia. Produção de leite. Hemograma. Imunidade inata.

ABSTRACT

SOBREIRA, N. M. **Clinical, hematological and imunological findings in persistently infected Holstein heifers and cows by Bovine Viral Diarrhea Virus.** [Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos em fêmeas da raça Holandesa persistentemente infectadas para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)]. 2018. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The aim of this study was to evaluate the clinical problems, the efficiency of production, reproduction, the innate and humoral immune response of Holstein heifers and cows persistently infected (PI) with BVDV. Therefore, 25 PI animals were selected using ELISA antigen of which, eight were heifers ≤ 12 months; six were heifers between 13 to 24 months; and eleven were animals from 25 to 36 months old. An uninfected group (NI) composed by negative females with same age of PI's. We observed that PI's presented more frequency of diarrhea ($P=0.012$) and Bovine Respiratory Disease (BRD) score ($P=0.004$), especially the animals from 25 to 36 months old. The PI's showed higher concentration of haptoglobin ($P=0.017$). During the lactations the milk production from NI cows was higher (8 to 18,2 liters) than PI ($P\leq 0.011$). Somatic cells count (SCC) were higher for PI than NI cows across milk production ($P\leq 0.066$). The mean of SCC observed was $0,2-0,5 \times 10^5$ (cells/mL) in NI group and $2,0-10,5 \times 10^5$ (cells/mL) for PI cows. The age at first insemination ($P=0.001$) and number of insemination required for the first pregnancy was higher for PI than NI heifers ($P=0.051$). For hematological evaluation, PI's showed lower hemoglobin ($P=0,098$), hematocrit ($P=0,084$), mean corpuscular hemoglobin ($P=0,092$), platelet ($P=0,040$), plateletcrit ($P=0,059$) and lymphocytes (absolute number $P=0.092$; relative $P=0,075$) than NI. In contrast, the percentage of monocytes was higher in PI than NI animals ($P=0.014$). In aggregate, the percent of phagocytic cells and the average phagocytic avidity (expressed as mean fluorescence intensity, MFI) for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were higher in PI than NI animals ($P\leq 0.079$). The percentage of cells producing endogenous reactive oxygen species (ROS) activity was lower in PI than NI animals ($P=0.005$). A similar pattern was observed in the percentage of cells producing ROS after exposure to *Staphylococcus aureus* ($P= 0.000$) or *Escherichia coli* ($P=0.000$). In contrast, the

value for endogenous ROS per cell activity (MFI) was higher in PI than NI animals ($P=0.011$). A similar pattern was observed for ROS MFI after stimulating with *Staphylococcus aureus* ($P=0.011$) or *Escherichia coli* stimulation ($P=0.013$). The median conventional SN titers for specific antibody recognizing BVDV, BRSV and BoHV-1 in serum were lower in PI than NI animals ($P=0.000$). The antibody titers for BPIV3 were similar between the groups animals ($P=0.146$). In aggregate, the total serum protein (TP) was lower in PI than NI cattle ($P=0.021$). In summary, PI heifers had more diarrhea, BRD, produced less milk, worst milk quality and poorer reproductive performance than NI cattle. Leukogram showed decreased cell types except monocytes. Overall, there was a higher endogenous level innate cell reactivity in PI heifers and cows than NI animals, probably because of the lower efficiency in ROS production. In relation to the specific immune system it appear that the PI animals were less efficient in clearance of antigens due to lower numbers of lymphocytes and related lower titers of specific antibody against respiratory viruses.

Keywords: Diarrhea. Bronchopneumonia. Milk production. Blood count. Innate Immunity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Esquema demonstrando o processo de transmigração dos granulócitos do sangue para os tecidos por intermédio dos receptores CD62L e CD11.	29
Figura 2-Vias de infecção do Vírus da Diarréia Viral Bovina.....	31
Figura 3-Ambiente no qual as fêmeas ficavam alojadas durante o período experimental	50
Figura 4-Colheita do material para o teste imunoenzimático direto.....	51
Figura 5-Frequências (%) geral e em diferentes faixas etárias de diarreia em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) para Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2).	61
Figura 6-Frequências (%) geral e em diferentes faixas etárias para Doença Respiratória Bovina (DRB) em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) para o Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2).	62
Figura 7-Frequências (%) das doenças durante o período pós-parto em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e não infectadas (NI) para o BVDV-2.	65
Figura 8-Valores médios e desvios-padrão para haptoglobina em fêmeas Persistentemente Infectados (PI) e não infectados (NI) BVDV-2.	66
Figura 9-Médias e desvios-padrão dos dias em lactação (DEL), produção de leite (PL), contagem de células somáticas (CCS) em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e Não Infectadas (NI) com BVDV-2.....	68
Figura 10-Média e desvio-padrão da idade na primeira Inseminação Artificial (IA), mediana do número de inseminações até a primeira prenhez em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV-2.....	69
Figura 11-Passo a passo empregado para a análise da fagocitose no programa FlowJo.	88
Figura 12-Passo a passo para a avaliação da produção de ERO's no programa Flow Jo.	89

Figura 13-Valores médios e desvios-padrão das variáveis hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Hto), em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV-2.	95
Figura 14-Valores médios e desvios-padrão dos índices hematimétricos Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV-2.....	96
Figura 15-Valores médios e desvios-padrão das plaqueta (PLT) e plaquetócrito (PQT), em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV-2.....	97
Figura 16-Médias e desvios-padrão para os componentes do leucograma em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI, n=25) ou não infectadas (NI, n=25) com o BVDV-2.....	100
Figura 17-Média e desvios-padrão da fagocitose estimulados com as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.....	104
Figura 18-Média e desvios-padrão da produção de Espécies Reativas a Oxigênio (ERO's) basal e estimulados com as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.....	105
Figura 19-Valores individuais e mediana para os títulos de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias em fêmeas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV.....	108
Figura 20-Valores médios e desvios-padrão da proteína sérica total em fêmeas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Frequências (Número de casos/ observações) de diarreia e Doença Respiratória Bovina (DRB) em fêmeas persistentemente infectadas (PI) e controle não infectadas (NI) com o BVDV-2	61
Tabela 2-Frequências (Número de casos/ observações) para os parâmetros respiratórios em fêmeas Persistentemente Infectadas (PI's) e não infectadas (NI) para o BVDV-2.	63
Tabela 3-Frequências (%) e valores absolutos para doenças durante o período pós-parto em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e não infectadas (NI) para o BVDV-2.....	64
Tabela 4-Valores médios e desvios-padrão do biomarcador Haptoglobina (HP) Persistentemente Infectados (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.....	65
Tabela 5-Médias e desvios-padrão para as variáveis dias em lactação (DEL), produção de leite (PL), contagem de células somáticas (CCS) do início (10-70 dias) ao final da lactação (167-218) em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e Não Infectadas (NI) com BVDV-2.....	67
Tabela 6-Média e devio-padrão da idade na primeira Inseminação Artificial (IA), mediana (valores máximo e mínimo) do número de inseminações até a primeira prenhez em fêmeas bovinas Holandeses persistentemente infectados (PI) e bovinos não infectados (NI).	69
Tabela 7-Valores médios e desvios-padrão dos componentes do eritrograma em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI=25) e bovinos não infectadas (NI=25).	94
Tabela 8-Médias e desvios-padrão para os componentes do leucograma em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI, n=25) ou não infectadas (NI, n=25) com o BVDV-2.....	99
Tabela 9-Média e desvios-padrão da fagocitose e produção de Espécies Reativas a Oxigênio (ERO's) basal e estimulados com as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.....	103

Tabela 10-Mediana (Valores mínimo e máximo) para os títulos de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias em fêmeas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV.....	107
Tabela 11-Valores médios e desvios-padrão da proteína sérica total em fêmeas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-Escores de fezes para a detecção de diarreia nas fêmeas PI's e NI's.....	54
Quadro 2-Escore para a detecção da Doença Respiratória Bovina.	55
Quadro 3-Distribuição dos reagentes usados para a avaliação da Fagocitose e produção de H ₂ O ₂	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BoHV-1	Herpevírus Bovino tipo 1
BPIV-3	Vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3
BRD	Doença Respiratória Bovina
BRSV	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
BVD	Diarreia Viral Bovina
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
CP	Citopatogênico
CCS	Contagem de Célula Somática
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cél	Célula
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
DEL	Dias em lactaçãp
dL	Decilitro
DM	Doença das Mucosas
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO'S	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Gramas
He	Hemácias
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hct	Hematócrito
HP	Haptoglobina
Kg	Kilogramas
IL	Interleucina
IFN	<i>Interferon</i>
L	Litros
Le	Leucócito
M	Momento
MFI	<i>Mean Intensity of Fluorescence</i>
Mh	<i>Mannhemia haemolytica</i>
NCP	Não Citopatogênico
NI	Não infectado
NETS	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NPI	Não persistentemente infectado
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PAMP	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PBS	Phosphate- Buffered Saline
PI	Persistentemente Infectado
PL	Produção de leite

PLT	Plaqueta
PT	Proteína total
PQT	Plaquetócrito
RDW	<i>Red cell Distribution Width</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia Polimerase
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SN	Soroneutralização
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO	25
2.2	RESPOSTA IMUNE AO BVDV.....	26
2.2.1	Fagocitose dos neutrófilos.....	26
2.3	TRANSMISSÃO	29
2.4	ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOHISTOPATOLOGIA	31
2.4.1	Doença das Mucosas (DM)/Digestório	32
2.4.2	Doença Respiratória.....	33
2.4.3	Síndrome hemorrágica	34
2.4.4	Mastite, CCS e Produção de Leite.....	35
2.4.5	Doença Reprodutiva.....	37
2.4.6	Quadros clínicos mistos	38
2.5	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, PROTEÍNA TOTAL E HAPTOGLOBINA	40
2.6	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	42
	CAPÍTULO 1- ASPECTOS CLÍNICOS, PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS DE FÊMEAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS PARA O BVDV.....	46
3	INTRODUÇÃO	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	REBANHO E MANEJO SANITÁRIO	49
4.2	TRIAGEM DOS ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)....	50
4.2.1	Teste imunoenzimático direto	50
4.2.2	Grupos experimentais.....	52
4.2.3	Avaliação dos animais PI's e Controle.....	53
4.2.4	Escores clínicos	53
4.2.5	Colheita de amostras sanguíneas.....	56
4.2.6	Exames laboratoriais	56
4.2.6.1	Separação do Buffy Coat para o RT-PCR	57
4.2.6.2	Transcriptase reversa e reação em cadeia da Polimerase (RT-PCR).....	57
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS.....	60
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS	60
5.2	AVALIAÇÃO DOS ESCORES CLÍNICOS	60
5.3	HISTÓRICO CLÍNICO DO REBANHO	64
5.4	BIOMARCADOR INFLAMATÓRIO HAPTOGLOBINA	65
5.5	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E PRODUÇÃO DE LEITE	66

5.6	DADOS REPRODUTIVOS	69
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	CAPÍTULO 2- RESPOSTA IMUNE INATA E ESPECÍFICA PARA	
	AS VIROSES RESPIRATÓRIAS DE FÊMEAS PI'S	80
8	INTRODUÇÃO	81
9	MATERIAL E MÉTODOS	83
9.1	REBANHO E MANEJO SANITÁRIO	83
9.2	TRIAGEM DOS ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)....	84
9.2.1	Teste imunoenzimático direto	84
9.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	85
9.3.1	Avaliação dos animais PI's e Controle.....	85
9.3.1.1	Colheita de amostras sanguíneas	85
9.3.1.2	Exames laboratoriais	85
9.3.1.2.1	Proteína total.....	86
9.3.1.2.2	Hemograma.....	86
9.3.1.2.3	Fagocitose e produção de ERO's	86
9.3.1.2.4	Soroneutralização para viroses respiratórias.....	90
9.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
10	RESULTADOS.....	92
10.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	92
10.2	AVALIAÇÃO DA FAGOCITOSE.....	101
10.3	SORONEUTRALIZAÇÃO PARA VIROSES RESPIRATÓRIAS	106
10.4	PROTEÍNA SÉRICA TOTAL	108
11	DISCUSSÃO	110
12	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS.....	115
13	CONCLUSÃO GERAL.....	117
	REFERÊNCIAS.....	118
	APÊNDICE A	125
	APÊNDICE B	128
	ANEXO A.....	129

1 INTRODUÇÃO GERAL

O BVDV apresenta distribuição mundial, com exceção da Antártica e dos países que já erradicaram o vírus. O agente infeccioso é responsável por grande impacto econômico na pecuária, observando-se prejuízos entre U\$ 0,50 a 687,80/cabeça (RICHTER et al., 2017). Segundo Guivens & Marley (2015), o custo do BVDV considerando-se todo o rebanho de corte americano é ao redor de U\$ 460 a 767 milhões por ano.

O primeiro registro da Diarreia Viral Bovina (BVD) ocorreu no estado de Nova York, sendo relatada como uma doença infecciosa ainda não conhecida em bovinos (OLAFSON; MAC CALLUM; FOX, 1946). Apesar do registro precoce, o agente viral foi isolado e nomeado apenas em 1957 por Lee e Gillespie. Desde então, o BVDV tem sido isolado em ruminantes de todos os continentes, destacando-se a sua capacidade de replicação e desencadeamento de doença reprodutiva em outras espécies domésticas como porcos, cabras, ovelhas e animais selvagens (BAKER, 1995; HOUE, 1999; POTGIETER, 1997; RIDPATH, 2010).

A soroprevalência do BVDV nos rebanhos da América do Norte e alguns países Europeus é ao redor de 60 a 80%, e a taxa de persistentemente infectado (PI) é de aproximadamente 0,5 a 2% (HOUE, 1999; FLORES et al., 2005). No Brasil, os primeiros relatos clínico-patológicos da BVD ocorreram no final dos anos 60, sendo os primeiros estudos sorológicos na década de 70. Segundo Pituco¹ (2004 apud FLORES et al., 2005, p.127), entre 1999 e 2004, o Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico, processou 17.090 amostras das quais 51,34% foram soropositivas. Alfieri² (2004 apud FLORES et al., 2005, p.127) relatou soroprevalência de 61,98% após o processamento de 5.711 amostras de soro provenientes de animais oriundos de diferentes estados brasileiros. A soropositividade foi de 74,5% no Mato Grosso do Sul, 68,4% no Mato Grosso, 67,1% em Rondônia, 65,8% na Bahia, 61,5% no Paraná, 61,4% em Goiás e 54,3% em São Paulo.

¹ PITUCO E. M. 2004. Comunicação pessoal (Laboratório de Viroses de Bovídeos, Instituto Biológico de São Paulo).

² ALFIERI A. A. 2004. Comunicação pessoal (Laboratório de Virologia Animal, Departamento Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina).

O BVDV é um vírus RNA de fita simples pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Pestivirus*, atualmente classificados em genótipos denominados BVDV-1 (agrupados em 12 subgêneros) e BVDV-2 (agrupado em 3 subgêneros). Recentemente um novo *Pestivirus* chamado *Hobi-like* foi identificado, sendo responsável por causar síndromes de doenças indistinguíveis das apresentações clínicas associadas às infecções por BVDV. A BVDV-1 e BVDV-2 podem apresentar os biótipos citopáticos e não citopáticos avirulento à altamente virulento (RIDPATH, 2010). No Brasil, a maioria dos isolados foram caracterizados como BVDV-1 não-citopático (NCP), embora vários isolados de BVDV-2 já tenham sido identificados (FLORES et al., 2005).

Os vírus citopáticos são raros e geralmente encontrados em associação com surtos de Doença da Mucosa (DM), uma forma rara e altamente fatal de infecção pelo BVDV (BAKER, 1995). A apresentação clínica da BVD varia dependendo genótipo do vírus e características do hospedeiro, tais como espécie acometida, *status* imunológico, fase reprodutiva, idade e de infecções concomitantes com outros agentes patogênicos. Embora o termo diarreia seja proeminente no nome da doença, as doenças respiratórias e reprodutivas associadas à infecção pelo BVDV são frequentemente relatadas (RIDPATH, 2010).

A transmissão da doença pode ocorrer de forma vertical ou horizontal direta e indireta. O resultado da infecção fetal dependerá da fase gestacional: ≤ 40 dias observa-se morte embrionária associada à diminuição da taxa de concepção; entre 40 a 120 dias podem ser originados os animais PI e imunotolerantes ao BVDV; entre 100 e 150 dias podem ocorrer deformidades congênicas; e infecções no terço final da gestação resultam em bezerras aparentemente saudáveis, livres do vírus e soropositivas (LINDBERG, 2003).

A imunossupressão é uma característica marcante na infecção pelo BVDV, pois esse agente infecta uma variedade de tipos celulares apesar da sua predileção por monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos. As consequências da infecção celular incluem morte celular como um evento extremo ou efeitos mais sutis na expressão de citocinas e síntese de moléculas co-estimuladoras. As mudanças no perfil de citocinas afetam diretamente a imunidade inata e adaptativa (BRODERSON et al., 2014; CHASE et al., 2015). A influência da infecção pelo BVDV sobre a atividade funcional dos neutrófilos tem sido pouco estudada, apesar

da importância dessas células como a primeira linha de defesa contra os agentes infecciosos em geral (CHASE et al., 2015).

A imunossupressão causada pelo BVDV resulta em resistência reduzida e maior gravidade da doença clínica após infecções secundárias. A interação de BVDV com patógenos secundários é considerada um dos fatores contribuintes para o Complexo de Doença Respiratória Bovina (BRD) (POTGIETER, 1997; CAMPBELL et al., 2004).

O BVDV é o vírus mais importante em países que erradicaram a Febre Aftosa. A maioria dos artigos apresentam dados virológicos e poucos apresentam dados clínicos e produtivos oriundos da infecção pelo BVDV seja em animais transitórios ou persistentemente infectados. Em relação à imunidade, existe uma vasta literatura sobre o efeito da infecção sobre as células da imunidade adaptativa, porém são raras as pesquisas focadas na atividade funcional dos neutrófilos.

A hipótese deste trabalho é que o BVDV influencia na resposta imune inata e específica para as viroses respiratórias, o que torna o hospedeiro susceptível à outras doenças. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos de fêmeas bovinas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina. Os objetivos específicos desta pesquisa contemplaram:

- a) o estabelecimento do perfil clínico, produtivo e reprodutivo;
- b) o estudo do padrão hematológico por meio do hemograma;
- c) a avaliação da atividade funcional dos granulócitos;
- d) e a avaliação da resposta imune específica pela titulação de anticorpos específicos para as viroses respiratórias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

O BVDV é o vírus RNA de fita simples pequeno, de partícula esférica com o diâmetro de 40 a 60 nanômetros, pertencente à família *Flaviviridae*, membro do gênero *Pestivirus* (RIDPATH, 2010).

Baseado na diversidade biológica e antigênica, o BVDV é classificado em dois genótipos distintos BVDV-1 e BVDV-2, subdivididos em biótipos citopáticos (CP) e não citopáticos (NCP) de acordo com a sua capacidade de produzir ou não efeito citopatogênico em cultivos celulares. O vírus NCP constitui 90% dos isolados de diagnósticos laboratoriais, sendo o CP relativamente raro e associado à Doença das Mucosas (WALZ et al., 2010).

O BVDV-1 é considerado o genótipo mundialmente mais prevalente, Fulton et al. (2005) avaliou a prevalência dos biótipos, genótipos e subgenótipos do BVDV nos Estados Unidos através da análise de 131 amostras positivas, das quais 76 eram provenientes de animais vivos e 55 oriundas de necropsia. Neste estudo foram encontrados 117 isolados do BVDV NCP, 11 CP e 3 casos com biótipos NCP e CP combinados. As amostras de BVDV foram segregadas em três subgenótipos dos quais 45,8% foram classificados BVDV-1b (60/131), 28,2% BVDV-1a (37/131) e 26,0% BVDV-2a (34/131) (FULTON et al., 2005).

No Brasil, entre 1995 e 2014, 89 Pestivirus foram isolados e genotipados a partir de amostras oriundas de bovinos, soro fetal bovino e de cultura de células contaminadas. Destes isolados, 53,9% eram BVDV-1, 33,7% BVDV-2 e 12,4% HoBi-like. Os subgenótipos predominantes foram BVDV-1a (35,9%), BVDV-2b (31,4%), BVDV-1b (10,1%), BVDV-1d (6,7%), BVDV-2c (2,2%) e BVDV-1e (1,1%) (SILVEIRA et al., 2017). Flores e colaboradores (2000) identificaram os principais genótipos e subgêneros através da análise filogenética de 17 isolados BVDV, observando-se 23,5% de BVDV-1a, 52,9% de BVDV-1b e 23,5% de BVDV-2.

Schirrmeier e colaboradores (2004) descreveram o *HoBi-like*, como um novo *Pestivirus* atípico identificado em lote de soro fetal bovino originário do Brasil, posteriormente no sudeste da Ásia e Europa. Estudos recentes sugerem que o *HoBi-like* possui muitas características semelhantes ao BVDV, incluindo

manifestações clínicas e a formação de animais PI (WEBER et al., 2014). Weber et al. (2014) avaliaram um rebanho de Pardo-Suiço, composto por 123 animais, provenientes da cidade de Pombal na Paraíba. Os autores detectaram quatro animais entre 5 a 7 meses positivos para *HoBi-like* por meio do isolamento viral e RT-PCR, reforçando a presença do *HoBi-like* nos rebanhos brasileiros. Os animais infectados pelo *HoBi-like* apresentavam manifestações clínicas respiratórias e digestivas.

Silveira e colaboradores (2017) avaliaram a prevalência do *HoBi-like* nos estados do Maranhão e Rio Grande do Norte, pela análise de 16.621 amostras de soro de bovino. As amostras de soro provenientes de 45 animais foram misturadas para a formação de *pool*, com posterior re-teste isolado das *pool* positivas. Nesta pesquisa foram identificadas, 17 animais positivos (0,1%) para o *HoBi-like* pela técnica RT-PCR.

2.2 RESPOSTA IMUNE AO BVDV

2.2.1 Fagocitose dos neutrófilos

Os neutrófilos apresentam alguns receptores de superfície como os receptores de manose e integrinas, que se ligam diretamente aos vírus. A fagocitose mediada pelo receptor de anticorpos é desencadeada pela ligação a bactéria opsonizada com a receptores de anticorpos presentes na superfície dos neutrófilos. Na fagocitose mediada pelo complemento, as partículas penetram nos neutrófilos sem que haja formação de “pseudópodes”, sugerindo que o processo de ingestão é fundamentalmente diferente daquele mediado por anticorpo. Após a ativação dos neutrófilos por IL-8 ou LPS, as proteínas dos grânulos dos neutrófilos e sua cromatina são liberadas no fluído extracelular (NETS- *neutrophil extracellular traps*). Estas fibras capturam as bactérias, destroem e eliminam os microorganismos. Os NETS são abundantes nos sítios de inflamação aguda e acabam arrastado as bactérias para o interior da célula. A destruição da bactéria ingerida ocorre por meio de dois processos distintos. O *burst* oxidativo envolve a geração de potentes

oxidantes e o outro mecanismo envolve a liberação de enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos dos grânulos intracelulares (TIZARD, 2008).

Os efeitos do BVDV sobre as células do sistema imune têm sido extensivamente estudadas, porém os neutrófilos têm sido negligenciados por essas pesquisas (CHASE et al., 2015). No levantamento de literatura foi encontrado apenas um artigo sobre a expressão de marcadores de ativação e fagocitose em bovinos PI's (BREWOO et al., 2007), além de um resumo sobre a infecção *in vitro* de neutrófilos apresentado no *95th Annual Meeting of the Conference for Research Workers in Animal Disease* pela equipe do Dr. Chase.

Os neutrófilos correspondem de 20 a 70% dos leucócitos sanguíneos, dependendo da idade do animal. Os neutrófilos atacam e destroem os microorganismos invasores após se tornarem-se ativados. Os neutrófilos se movimentam e migram para o local de invasão por meio de efeitos quimiotáticos (TIZARD, 2008).

Alguns artigos demonstraram que animais persistentemente e transitoriamente infectados apresentam redução no número de neutrófilos (WOOD et al., 2004; PICCININI et al., 2006; GANHEIM et al., 2005), porém este decréscimo é mais sutil que a linfopenia associada às infecções pelo BVDV (CHASE et al., 2015).

Recentemente foi determinado o efeito do BVDV em neutrófilos *in vitro*. A exposição dos neutrófilos ao BVDV NCP ou CP não resultou em apoptose, mas diminuiu a expressão dos receptores CD62 e CD11 (CD18). Esses dois receptores são importantes moléculas de adesão dos leucócitos às células endoteliais durante o processo de migração e diapedese da circulação sanguínea aos tecidos, indicando que o vírus pode inibir a migração dos neutrófilos (Figura 1). A pesquisa relatou que os neutrófilos expostos ao BVDV *in vitro* aumentam a expressão do receptor CD14, em contrapartida a expressão desse marcador está reduzida em macrófagos infectados pelo BVDV. O CD14 é parte do complexo receptor *Toll-like* 4, que reconhece predominantemente o lipossacarídeo da parede celular das bactérias Gram negativas. Ao contrário dos monócitos/macrófagos, o CD14 do neutrófilo não são naturalmente expressos, mas são induzidos pela exposição dos Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMP's). A ligação dos PAMP's com o receptor CD14 dos neutrófilos resulta na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1. A redução da diapedese dos neutrófilos associada ao seu papel na indução de resposta pró-inflamatória torna os animais infectados pelo BVDV às

infecções secundárias, especialmente pelos agentes bacterianos (THAKUR et al., 2014; CHASE et al., 2015).

Brewoo et al. (2007) estudaram a atividade fagocítica dos granulócitos e monócitos estimulados com *Escherichia coli* (*E. coli*) em 15 animais, entre dois e cinco anos de idade, provenientes de fazendas experimentais localizadas em *Wisconsin*. Estes animais pertenciam a dois grupos experimentais, sendo o primeiro composto por seis animais soropositivos não infectados e nove animais PI's infectados com o BVDV-1. Estes autores não observaram diferenças na atividade fagocítica e nem no perfil leucocitário entre os grupos experimentais.

Em relação ao sistema imune específico ocorre leucopenia por linfopenia. O vírus promove apoptose dos linfócitos, resultando em depleção linfóide das células B, células T auxiliares (CD4⁺), T citotóxicas (CD8⁺) e células T gama-delta em diferentes proporções de acordo com a virulência da cepa do BVDV.

Ganheim et al. (2005) estudaram as mudanças nas contagens dos leucócitos e nas populações de linfócitos em bezerros machos de doze semanas de vida. Para tanto, os autores distribuíram 24 bezerros em quatro grupos experimentais: bezerros não infectados; bezerros infectados experimentalmente com o BVDV; bezerros infectado com *Mannhemia haemolytica* (Mh); e bezerros infectados com BVDV associado Mh. A infecção por Mh induziu aumento dos valores de leucócitos totais e neutrófilos, enquanto os linfócitos diminuíram. Nos bezerros infectados com BVDV associado a Mh houve diminuição dos leucócitos totais e linfócitos. Enquanto o grupo BVDV apresentou diminuição dos valores de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos. Em relação às subpopulações de linfócitos observou-se decréscimo significativo na proporção de células CD4⁺, CD8⁺ e subpopulação de gama-delta WC1⁺, tanto para o grupo BDVD quanto para o BVDV associado a Mh.

Molina et al. (2012) avaliaram os parâmetros hematológicos de quatorze bezerros infectados experimentalmente com BVDV-1 NCP, para isso mensuraram as manifestações clínicas, população de leucócitos totais, subpopulações dos linfócitos, a concentração sorológica das citocinas e as proteínas de fase aguda. O momento da viremia coincidiu com a depleção dos leucócitos e com a presença das manifestações clínicas de hipertermia, diarreia, secreção nasal e ocular. A leucopenia foi caracterizada por diminuição dos linfócitos, monócitos e neutrófilos. Os autores observaram aumento das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-12 e das proteínas

de fase aguda amilóide sérica A e haptoglobina. Durante a infecção observou-se depleção transitória de células $CD4^+$.

Figura 1-Esquema demonstrando o processo de transmigração dos granulócitos do sangue para os tecidos por intermédio dos receptores CD62L e CD11.

Fonte: Sobreira adaptado de Ley et al. (2007)

2.3 TRANSMISSÃO

A transmissão vertical pelo BVDV possui grande importância na epidemiologia e patogenia da doença (Figura 2). O BVDV tem a capacidade de atravessar a barreira transplacentária de fêmeas bovinas com <40 dias de gestação, especialmente àquelas não vacinadas, resultando em infertilidade temporária, queda nas taxas de concepção, morte embrionária, abortamento, mumificação fetal e natimortalidade. Após este período, pode ocorrer a formação do animal PI, má formação fetal e nascimento de animais soropositivos (BAKER, 1995; LIEBLER-TENORIO, 2005; OIE, 2015).

A infecção uterina do BVDV NCP de 40 a 125 dias de gestação origina animais PI's, que apresentam viremia ao longo de sua vida e imunotolerância às proteínas virais. O feto nasce infectado porém soronegativo devido à imunotolerância (SIMIRNOVA et al., 2012; RIDPATH et al., 2012). Os animais PI's são aparentemente saudáveis ao nascimento ou apresentam defeitos congênitos na pele, esqueleto e sistema nervoso (BAKER, 1995). A infecção das fêmeas gestantes, entre 120 a 150 dias de prenhez (fase organogênese), produz animais com má-

formações e defeitos congênitos no sistema nervoso e olhos. A infecção durante o final da gestação (>150 dias) resulta em infecção transitória, com produção de anticorpos e eliminação do vírus (RADOSTITIS; LITTLEJOHNS, 1988).

As bezerras PI's infectadas por algumas cepas de BVDV ainda na gestação podem apresentar anormalidades esqueléticas incluindo membros curtos, cabeça estreita, com olhos abaulados e mandíbula proeminente. Durante seu desenvolvimento, as bezerras apresentavam pêlo seco e aspero, musculatura pouco desenvolvida, aumento abdominal com rúmen sobredimensionado (STOKSTAD; LOKEN, 2002).

O PI imunotolerante infectado pela cepa NCP ainda no período fetal quando desafiado por uma cepa de BVDV citopático após nascimento pode desenvolver Doença das Mucosas. Outra hipótese é a mutação do BVDV NCP em CP na fase pós-natal (BAKER, 1995; LINDBERG, 2003).

Os animais PI's são os principais reservatórios do vírus, sendo responsáveis pela transmissão e manutenção da BVDV no rebanho, devido à liberação contínua de vírus no meio ambiente (HOUE, 1999).

A transmissão vertical do BVDV ocorre pelo contato direto entre o animal infectado e o susceptível (BAKER, 1995). O vírus também pode ser transmitido indiretamente para os bovinos de qualquer idade, por meio de diferentes materiais contaminados como palpação retal, injeções, fômites, sêmen de touros infectados e embriões contaminados (HOUE, 1999; LINDBERG, 2003).

Arenhart et al. (2009) avaliou a transmissão do BVDV sob diferentes condições de criação. Neste estudo, bezerros soronegativos foram alojados com um PI em sistemas de criação intensivo e extensivo, observando-se soroconversão de 100% dos animais confinados após 30 dias de experimento. Os animais criados sob o sistema de criação extensiva foram mais tardios, observando-se 77% de soroconversão após 100 dias de confinamento. Os resultados demonstram que os animais mantidos em contato intensivo e com alta densidade populacional apresentam transmissão notadamente mais rápida.

O período de incubação da BVD é de aproximadamente 5 a 7 dias, a viremia é detectada nas primeiras 24 horas após a infecção, podendo persistir por até 15 dias (BAKER, 1995). Sendo assim, o BVDV pode ser detectado até 14 dias após a infecção, em seguida, observa-se a produção de anticorpos neutralizantes e a

eliminação do vírus. O vírus geralmente não é detectado após 14 e 21 dias após a infecção (GIVENS; MARLEY, 2013).

Figura 2- Vias de infecção do Vírus da Diarréia Viral Bovina.

Fonte: Sobreira adaptado de Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, 2018

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOHISTOPATOLOGIA

O quadro clínico das infecções causadas pelo BVDV dependerá do *status* imune do hospedeiro e estirpe do BVDV (STOKSTAD; LOKEN, 2002). Antigamente o BVDV-2 era considerado mais virulento que o BVDV-1, devido a sua capacidade de causar doença grave e trombocitopenia, porém pesquisas comprovaram que algumas cepas de BVDV-1 podem desencadear estas formas clínicas da doença (RIDPATH, 2010; BRODERSEN, 2014). Fulton et al. (2005) demonstraram que não existem diferenças nas frequências de doença respiratória ou entérica (ou ambos) entre os genótipos de BVDV 1 e 2.

2.4.1 Doença das Mucosas (DM)/Digestório

A Doença das Mucosas é a forma mais grave da re-infecção dos animais PI's pelo BVDV CP ou mutação do NCP em CP. A DM geralmente é relatada em animais entre seis meses e os dois anos de idade, observando-se baixa morbidade (<5%) e alta mortalidade (100%) (RADOSTITS; LITTLEJOHNS, 1988; LINDBERG, 2003; FLORES et al., 2005). As manifestações clínicas da DM são hipertermia, anorexia, enterite catarral, hemorrágica ou fibrino-necrótica e placas de Peyer edematosas, necróticas e hemorrágicas. Lesões ulcerativas são observadas nas narinas, cavidade nasal, cavidade oral, esôfago, rúmen, omaso, abomaso, intestinos e ceco (BAKER, 1995; LINDBERG, 2003; LIEBLER-TENORIO, 2005). A doença gastrointestinal é apenas uma manifestação clínica da Doença das Mucosas, ou seja as diarreias podem ser detectadas isoladamente tanto em animais transitoriamente infectados ou PI's.

Liebler-Tenório et al. (2000) estudaram nove animais que manifestaram Doença das Mucosas precoce, após duas semanas de infecção experimental, e cinco animais que manifestaram a DM tardia entre 42 e 115 dias após a infecção. Os animais possuíam idade entre dois meses a 2,4 anos. Foram examinadas as alterações teciduais e a distribuição do antígeno da BVDV. Lesões macroscópicas foram encontradas tanto na parte superior quanto na parte inferior do trato intestinal. Os animais com DM tardia apresentavam lesões na cavidade oral e trato intestinal, observando-se hiperplasia e atrofia das mucosas. Na DM precoce e tardia observou-se depleção intensa da Placa de Peyer, com completa perda de arquitetura e a presença de lesões vasculares na DM tardia.

Liebler-Tenorio, Ridpath, Neill (2004) estudaram a distribuição e lesões associadas ao BVDV-2, para tanto, foram utilizado 13 animais infectados transitoriamente (TI), dois animais PI's e quatro animais controle não infectados. Nos PI's, observou-se extensa distribuição do BVDV-2 em todos os órgãos e tecidos (tecido linfóide, intestinos, trato respiratório superior e inferior). Apesar disso os autores não observaram lesões macroscópicas. Os TI's apresentaram o antígeno viral seis dias pós-infecção, observando-se a eliminação do vírus entre 9-13 dias na maioria dos animais. Os autores observaram depleção do tecido linfóide nos dias 6, 9 e 13 e re-população entre nove e 13 dias após a infecção. Este estudo ainda

comprovou a distribuição do BVDV NCP nos tecidos linfóides e no gastrintestinal sem a presença de lesões teciduais nos animais PI's.

Teichmann; Liebler-Tenorio; Pohlenz (2000) investigaram as mudanças dos folículos associados à placa de Peyer do intestino delgado em bezerros com idade entre 2,5 a 7 meses. Destes animais 13 apresentavam manifestações de DM experimentalmente induzida, 5 eram PI's clinicamente saudáveis e 2 animais TI. Os autores observaram alterações histológicas dos animais acometidos com fase precoce da DM, os folículos linfóides da placa de Peyer e intestino delgado apresentavam grande quantidade de linfócitos e macrófagos apoptóticos. Já na fase avançada da DM, os folículos linfóides estavam infectados, permeados por macrófagos e células dendríticas. Não foram observadas diferenças morfológicas entre folículos linfóides nos bezerros NI e no PI clinicamente saudável.

2.4.2 Doença Respiratória

Patógenos respiratórios virais, como o Vírus da Diarréia Viral Bovina 1 (BVDV-1), Vírus da Diarréia Viral Bovina 2 (BVDV-2), Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1) e o Vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3 (BPIV-3) desempenham um papel importante na patogênese da doença respiratória devido à sua capacidade de prejudicar a integridade do trato respiratório superior, causar imunossupressão, promover infecção bacteriana secundária e causa doença clínica aguda (STOKKA, 2010). Os linfócitos T CD4⁺ e CD8 são importantes mediadores da resposta imune celular (CHASE, 2015).

Silflow, Degel e Harmsen (2005) estudaram os mecanismos de defesa imunológica de quatro bezerros infectados experimentalmente com BVDV-1 CP intrabronquial no dia 0 e no dia 31. As respostas celulares e humorais foram avaliada por lavados broncoalveolar. A liberação do BVDV das vias aéreas inferiores após a infecção secundária foi rápida, dentro de 4 dias, e sustentada durante um período de 1 mês período. O número total de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do lavado broncoalveolar aumentou > 200 vezes no dia 10 pós a primeira infecção e aumentou em > 70 vezes após 4 dias da segunda infecção experimental com BVDV. Os linfócitos T gammadelta aumentaram em 100 vezes ao dia 7 e permaneceram em

níveis pelo menos 10 vezes maiores do que a pré-infecção ao longo do estudo. Os níveis de linfócitos B foram 30 vezes superiores aos níveis pré-infecciosos no dia 10 e aumentaram ainda mais para níveis 100 vezes maiores após a infecção secundária por BVDV. Subpopulações ativadas de CD4⁺ e CD8⁺ aumentaram quase 300 e 150 vezes, respectivamente, no dia 10, e para níveis 100 e 50 vezes 4 dias após a segunda infecção. As subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ de memória aumentaram para níveis 170 e 120 vezes, respectivamente, no dia 10, e para níveis de aproximadamente 400 e 300 vezes, respectivamente, 7 dias após o segundo desafio com o BVDV. Os autores observaram que as respostas imunes inata mediadas por células no pulmão bovino com BVDV são capazes de eliminar o vírus dentro de 2-3 semanas pós infecção. Além disso, as populações activadas de linfócitos T por imunidade inata e de memória, combinadas com a produção específica de anticorpos de BVDV, contribuem para a eliminação rápida de BVDV após segunda exposição viral.

2.4.3 Síndrome hemorrágica

A Síndrome Hemorrágica é caracterizada por trombocitopenia, resultando em diarreia sanguinolenta, epistaxe, hemorragia nos locais de injeções, hemorragia na superfície das mucosas, hifema, pirexia (41- 42° C) e leucopenia (GROOMS et al., 2004). A trombocitopenia está relacionada à infecção da medula óssea pelo BVDV, que é capaz de detectar e infectar os megacariócitos, o que acarreta na diminuição da produção e função dos trombócitos (LIEBLER-TENORIO, 2005).

Walz et al. (1999) caracterizaram o modelo de trombocitopenia induzida por BVDV-2, assim como o desenvolvimento da doença. Para tanto, nove bezerros não colostrados e imunizados por transfusão de plasma de vacas soronegativas foram distribuídos em dois grupos experimentais: controle não infectado (n=4); e experimentalmente infectados pelo BVDV-2 (n=5). Os autores avaliaram o perfil hematológico, exame físico e isolamento viral dos bezerros por 12 dias após a infecção o perfil hematológico. Além disso, foram avaliados os aspectos patológicos e virológicos após eutanásia e necropsia. Os bezerros infectados desenvolveram diarreia intensa e apresentaram pirexia (>39,4°C). Após sete dias de infecção, os

animais infectados apresentavam menor número de leucócitos e plaquetas. Além disto, as plaquetas eram de tamanho heterogêneo com vesiculações nas membranas. Os animais infectados também apresentaram hemorragias, petéquiais no rúmen, abomaso, endocárdio, depleção linfóide, redução do tamanho folicular no íleo, baço e lesões nas mucosas em três animais. Na imunohistoquímica, observou-se antígenos de BVDV nos megacariócitos com evidências concomitantes de necrose e hiperplasia dos megacariócitos.

2.4.4 Mastite, CCS e Produção de Leite

Waage (2000) através de um estudo retrospectivo longitudinal avaliou se a exposição do BVDV afetava a saúde do úbere em rebanhos leiteiros da Noruega. Os rebanhos que apresentavam um aumento dos títulos de anticorpos no tanque de leite foram considerados como expostos ao BVDV, os rebanhos soronegativos ou com títulos de anticorpos extremamente baixos foram denominados grupo controle. A incidência de mastite clínica anual, a contagem de CCS do tanque e o descarte anual devido à mastite foram comparados no período pré exposição e dois anos após a exposição. Os rebanhos expostos ao BVDV apresentaram maior incidência de mastite clínica comparados aos rebanhos não expostos. Não foram observadas diferenças na CCS do tanque e nem na taxa de descarte dos animais.

Berends et al. (2008) investigaram o efeito da certificação de propriedades livres de BVDV na Holanda por meio da análise de fertilidade e saúde da glândula mamária. Os rebanhos foram distribuídos em dois grupos experimentais: o primeiro grupo era constituído por rebanhos livres de BVDV, após o processo de certificação e o segundo grupo era composto por rebanhos que não participavam do programa de certificação de propriedades livres de BVDV. Os rebanhos com *status* imune desconhecido apresentaram maiores taxas de abortamento e maior incidência de mastite em relação aos rebanhos livres. Não foram observadas diferenças na prevalência de mastite ou de CCS no tanque.

Rola et al. (2014) estudaram o efeito da infecção por BVDV na contagem de CCS do tanque em 29 rebanhos não vacinados na Polônia. O ELISA anticorpo foi realizado nas amostras de tanque de leite e o RT-PCR em amostras de pool de soro

sanguíneo com a finalidade de determinar o *status* de infecção, assim como a presença de animais PI's nas propriedades. A média da CCS do tanque não variou entre rebanhos soronegativos e soropositivos. Nos rebanhos soropositivos a CCS não foi diferente antes e após a eliminação dos PI.

Tiwari et al. (2007) determinaram a associação da soropositividade para doenças virais como o Vírus da Leucose Enzoótica bovina, BVDV-1, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Neospora Canium* em relação à produção de leite em 305 dias de lactação, gordura e proteína do leite em 9.834 vacas de 342 rebanhos do Canadá. As vacas soropositivas para o BVDV apresentaram redução de leite equivalente a 368kg/vaca, 9,35kg de proteína e tendência a redução de 10,2kg de gordura comparadas com vacas de rebanhos soronegativos. Os resultados sugerem que o controle da BVD podem diminuir o impacto econômico da doença nos rebanhos.

Laureyns et al. (2013) estudaram a associação entre o *status* da BVD baseado na detecção do título de anticorpo no tanque de leite e a CCS mensal do tanque em 243 rebanhos da Bélgica. Os rebanhos foram divididos em cinco grupos dependendo da titulação de anticorpos encontrada no tanque: soronegativos; baixa; moderada; alta titulação de anticorpos; e ativamente ou recentemente infectada. Os resultados sugeriram que os rebanhos soronegativos apresentaram menores CCS no tanque em relação aos outros quatro grupos.

Tschopp et al. (2017) estudaram o efeito da erradicação do BVDV em diferentes parâmetros de saúde, produção e fertilidade em 110 rebanhos Suíços que completaram o programa de erradicação da doença. Foram selecionados rebanhos que tinham ao menos dois animais PI's, sendo que um deles deveria ter a idade mínima de um ano e meio quando identificado; e o grupo controle deveria ser soronegativo. Os parâmetros foram comparados entre os grupos antes (2007) e após (2012) da erradicação do BVDV. Os rebanhos positivos apresentaram maiores produções de leite após a erradicação do vírus. A CCS e ocorrência de mastite subclínica dos rebanhos positivos eram maiores em relação grupo controle nos dois períodos de avaliação.

2.4.5 Doença Reprodutiva

Pinto (2016) verificou que a produção *in vitro* de embriões em meios contendo diferentes genótipos de BVDV afetou a taxa de clivagem, número de embriões produzidos e maior número de estruturas degeneradas. Shin & Acland (2000) encontraram antígenos virais no tecido ovariano e útero de PI's sugerindo a vulnerabilidade dos órgãos reprodutivos.

Rodning et al. (2012) avaliaram o impacto da introdução de animais PI's na reprodução de novilhas *naïve* no estado do Alabama, Estados Unidos. Foram utilizadas 68 novilhas distribuídas em dois grupos experimentais. O primeiro grupo era composto por 34 novilhas soronegativas para o BVDV, enquanto o segundo grupo era composto por 34 novilhas expostas a cinco PI's (BVDV-1a, BVDV-1b e BVDV2) com 50 dias prévios à estação de monta. Em seguida, os touros foram mantidos com estes animais por 78 dias, observando-se prenhez em 33 novilhas de cada grupo. No grupo exposto ao vírus, observou-se o nascimento de um natimorto e morte em outro bezerro três dias após o nascimento. No grupo de novilhas não expostas observou-se apenas um óbito de bezerro aos quatro meses de idade. A introdução de animais PI 50 dias antes da estação de monta não apresentou impacto negativo na performance reprodutiva das novilhas, porém o momento da exposição ao BVDV durante o período gestacional foi muito precoce

Grooms, Ward e Brock (1996) avaliaram as diferenças morfológicas nos ovários de seis vacas PI's comparando-as com seis vacas não infectadas. As vacas persistentemente infectadas com BVDV parecem ter alterações morfológicas significativas em seus ovários.

Altamiranda et al. (2013) estudaram o efeito do BVDV NCP no trato reprodutivo de sete novilhas PI's. Os animais foram ovariectomizadas com idade entre 18 e 36 meses para a avaliação da população folicular ovariana, assim como a performance dos oocistos através da fertilização *in vitro*. Os antígenos virais foram identificados em todo o tecido ovariano, e no exame microscópico observou-se queda no número de folículo das regiões corticais dos ovários. O BVDV foi encontrado em dois embriões obtidos através dos oocistos de uma PI e no meio utilizado para o cultivo dos embriões na fertilização *in vitro*. Os autores concluíram que o BVDV provoca alterações nas populações foliculares dos ovários, afetando

diretamente o mecanismo de formação do embrião, o que pode explicar a baixa taxa de clivagem e desenvolvimento dos embriões.

Em geral, a infecção pelo BVDV em fêmeas gestantes imunossuprimidas resulta em 100% de transmissão transplacentária associadas com formação de animais imunotolerantes, repetição de cio, perda embrionária, abortamento, má-formação congênita e prematuridade.

2.4.6 Quadros clínicos mistos

Flores et al. (2000) descreveram o quadro clínico e anatomo-patológico de dois animais com infecção transitória pelo BVDV-2 NCP de isolados de *buffy-coat* e baço. O primeiro animal (novilha de 7 meses) morreu em sete dias, devido à anorexia progressiva, atonia ruminal, diarreia sanguinolenta, tenesmo, desidratação, congestão conjuntiva, dificuldade respiratória e secreção nasal purulenta. As observações macroscópicas na necropsia incluíam congestão de mucosa, ulcerações extensas e profundas na língua, palato, gengiva, áreas de congestão e fibrina no intestino delgado e petéquias hemorrágicas no miocárdio e epicárdio. As manifestações tiveram a duração de 7 a 10 dias, seguida de morte. O animal 2 manifestava retardo no crescimento, apatia, anorexia, doenças imunossupressoras, diarreia, dermatite interdigital, artrite, broncopneumonia crônica e conjuntivite, sendo eutanasiado após sete meses. Em relação aos achados anatomo-patológicos observou-se broncopneumonia, erosões e ulcerações no trato digestivo, placas necróticas no palato duro, língua e gengiva.

Shin & Acland (2000) suspeitaram de infecção por BVDV na necropsia de três animais após a observação de úlceras oral, úlceras abomasais e necroses em placas de peyer. O BVDV foi isolado de amostra de *pool* de tecidos de dois animais (fígado, rim e baço). O primeiro animal era uma novilha de 21 meses, inseminada quatro vezes e com histórico de retorno ao cio e diarreia sanguinolenta intensa com muco. O segundo animal era uma vaca de oito anos de idade com hemorragia intensa no intestino. Na imunohistoquímica foram encontrados antígenos virais em células epiteliais e não epiteliais dos órgãos examinados: trato gastrintestinal, fígado, pâncreas, pulmão, órgãos linfáticos (baço e linfonodos), glândula adrenal, ovário,

útero e glândula mamária. Os achados suportam a hipótese que os PI's eliminam a BVDV por todas as vias e que a vulnerabilidade dos órgãos reprodutivos pode ser um dos fatores de infertilidade já que a infecção está associada com ovários e útero.

Courtenay et al. (2007) relataram a ocorrência da infecção pelo BVDV-2 transitório em uma propriedade com 200 vacas em lactação localizada no Reino Unido, a princípio sem histórico de vacinação e com resultados negativos para anticorpos de BVDV no tanque de leite. A infecção pelo BVDV-2 afetou novilhas e vacas que manifestaram depressão, anorexia, agalactia, pirexia (41,5 a 42,0°C), diarreia, dispnéia e abortamento. A mortalidade dos animais adultos associadas à diarreia foi de aproximadamente 6%. A intensidade e o progresso da infecção pelo BVDV-2 contribuíram para outras doenças como Coronavirose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Febre Catarral Maligna. O exame *pos-mortem* revelou ulcerações gastrintestinais. Outros três bezerros morreram de broncopneumonia.

Booker et al. (2008) investigaram o efeito da infecção de BVDV na saúde e performance de 7.132 bezerros de corte vacinados para BVDV-1 e 2, provenientes da província de Alberta no Canadá. Os animais ficavam alojados em 25 lotes com a presença ou não de animais PI infectados pelo BVDV-1 e 2. Neste estudo não foram encontradas diferenças em relação à morbidade, ganho de peso e consumo de matéria seca entre grupos. A taxa de mortalidade por enterites foi maior nos lotes que continham animais PI's (Lote com PI= 0,24%; Lote sem PI= 0,03%; Risco Relativo = 7,92%).

Waldner; Kennedy (2008) avaliaram a saúde, peso, anticorpos para BVDV e BoHV-1 e taxa de PI's em bovinos de rebanho de corte provenientes de três províncias do Canadá. Foram selecionados 1.782 bezerros de 61 rebanhos com idade aproximada de 227±43 dias. Os autores não observaram associação entre animais soropositivos para o BVDV ou BoHV-1 com a ocorrência de abortamento, nascimento de prematuros, natimortalidade e infertilidade. O risco de morte era maior em rebanhos onde os PI's eram detectados. Os PI's apresentavam maior histórico de tratamento e menor peso do que os animais saudáveis. Os bezerros que apresentavam títulos de anticorpo para BVDV também possuíam menor peso em relação àqueles sem evidência de exposição. A infecção por BVDV foi um indicativo da presença de animais PI, evidência sorológica da infecção transitória apresentando maiores riscos de morte, tratamento e de pesos menores ao desmame.

Bachofen et al. (2010) analisaram 146 casos de animais PI com alterações clínicas por meio de estudo retrospectivo, prospectivo e laudos de necrópsia. Destes animais, 41% possuíam o histórico de diarreia não responsiva aos tratamentos, 20% broncopneumonia e 9% casos mistos de ambas às doenças. Estes autores relataram que 45% dos animais apresentavam queixas na anamnese de outros problemas concomitantes como abortamento, laminite e outras doenças do casco, anemia e retardo no crescimento.. Alterações patológicas no pulmão e alterações na mucosa dos órgãos (muflo e intestino grosso) foram os achados de necrópsia mais frequentes. Em muitos casos, as lesões eram observadas em múltiplos locais do trato gastrointestinal como no abomaso, intestino delgado e grosso. Os animais que apresentavam alterações pulmonares eram mais jovens, e os animais com alterações nas mucosas tinham idade >12 meses. O genótipo de maior ocorrência era o BVDV-1.

Ridpath et al (2013) compararam as manifestações clínicas de 24 bezerros infectados transitoriamente, distribuídos em quatro grupos experimentais: infecção BVDV-2 de alta virulência (n=6); infecção BVDV-2 de baixa virulência; infecção com “*HoBi-like*” (n=6) e controle não infectado. Todos os animais infectados com as viroses apresentaram diminuição dos leucócitos circulantes. Os seis animais dos grupos infectados com o BVDV de baixa e alta virulência e apenas três do grupo *HoBi-like* apresentaram pirexia. Apenas os animais do grupo BVDV-2 altamente virulento apresentaram trombocitopenia, e a diarreia foi observada em todos os bezerros infectados com o BVDV-2 altamente virulento e em dois bezerros do grupo BVDV-2 de baixa virulência.

2.5 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, PROTEÍNA TOTAL E HAPTOGLOBINA

Wood et al. (2004) estudaram as alterações hematológicas observadas em bezerros, entre seis a oito meses, experimentalmente infectados com BVDV-2. Os bezerros foram distribuídos em três grupos: o primeiro grupo era constituído por 12 bezerros inoculados com isolados de BVDV-2 de alta virulência; o segundo grupo era constituído por seis bezerros inoculados com BVDV-2 de baixa virulência; e o terceiro grupo era composto por três animais não infectados. O número de neutrófilos, linfócitos e plaquetas diminuíram em todos os bezerros infectados,

especialmente no grupo de bezerros infectados com a cepa de alta virulência em relação ao vírus de baixa virulência. Os animais de baixa virulência apresentaram apenas pirexia, enquanto os de alta apresentaram anorexia, pirexia, diarreia, descarga nasal e dispnéia entre oito e quatorze dias pós infecção.

Piccinini et al. (2006) avaliaram o efeito do BVDV sobre as células sanguíneas em 45 bezerros, entre cinco a nove meses de idade, distribuídos em dois grupos experimentais: o primeiro grupo era constituído por 34 animais PI's BVDV-1 NCP; e o segundo grupo era constituído por nove animais do grupo controle, sendo que dois estavam transitoriamente infectados. Os animais PI's apresentaram diminuição significativa nos leucócitos totais, granulócitos e da proporção de monócitos em relação ao grupo controle. As plaquetas e os valores relativos de linfócitos apresentaram aumento em relação ao grupo controle.

Avci, Yavru e Bulut (2010) avaliaram as alterações dos parâmetros hematológicos em animais negativos e positivos para o antígeno da BVD. O número de leucócitos e as proporções de linfócitos e monócitos eram menores nos animais BVDV antígeno positivos, enquanto o valor relativo de granulócitos foi maior em comparação com o animais BVDV negativos.

Stokstad & Loken (2002) avaliaram o perfil bioquímico e hematológico de 22 bezerros gerados a partir da infecção fetal de 22 novilhas soronegativas entre 74 a 82 dias de gestação. Destes, nasceram 18 bezerros PI e 4 não PI (NPI). Durante os primeiros meses de vida, quatro PI's apresentaram diarreia e tosse moderada. Os achados de necropsia dos quatro animais NPI revelaram moderada hipoplasia cerebelar e hidrocefalite. Os PI's apresentaram valores aumentados de hemoglobina e hemácias, porém não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos dos PI's em relação aos NPI's. Observaram no perfil proteico, aumento do fibrinogênio e decréscimo da proteína total a partir de duas semanas de idade, além disso os autores observaram diminuição no número de plaquetas e aumento no número de leucócitos. Os PI's eram pequenos e mais leves em relação aos NPI's, indicando retardo no crescimento devido a infecção.

Muller-Doblies et al. (2004) avaliaram o efeito da infecção viral pelo BVDV sobre os parâmetros da resposta imune inata em seis bezerros imunocompetentes, entre três e seis meses de idade, infectados experimentalmente pelo BVDV NCP. Os autores observaram os achados clínicos e virológicos, assim como a regulação das proteínas de fase aguda como a haptoglobina e a amilóide sérica A. A infecção

transitória provocou aumento da temperatura corporal, descarga nasal, tosse esporádica, leucopenia, soroconversão e recuperação completa após três semanas. O número de leucócitos apresentaram menores valores mínimos após três dias de infecção. As proteínas de fase aguda apresentaram níveis elevados. A amilóide sérica aumentou entre 4 e 13, e a haptoglobina aumentou entre 8 e 11 dias após a infecção.

2.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da BVDV pode ser realizado a partir de uma variedade de amostras como soro, sangue total, sêmen, *swab* nasais, *buffy coat* e outros tecidos (WALZ et al., 2010).

No método direto, a detecção do antígeno viral pode ser indicativa de uma infecção persistente ou transitória, para discriminar conclusivamente o diagnóstico é necessário repetir o exame 30 dias após a triagem inicial (CORNISH et al., 2005).

O isolamento viral, é uma técnica trabalhosa e de alto custo, porém é o método laboratorial reconhecido como o teste ouro pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o BVDV (SALIKI; DUBOVI, 2004). Segundo Walz e colaboradores (2010) o teste de microtitulação de isolamento viral não deve ser utilizado em bezerros com idade <3 meses devido a interferência de imunidade colostrar.

O PCR é baseado na detecção do RNA (RT-PCR) do BVDV. Este teste detecta infecção aguda, infecção persistente e animais vacinados com vacina viva modificada. Esta técnica molecular permite a diferenciação entre os genótipos do BVDV, e possui alta sensibilidade, o que possibilita a sua aplicação em amostras combinadas (*pool*) (DUBOVI, 2013).

O ELISA antígeno é um método simples e rápido realizado através de kits comerciais para a detecção do antígeno viral através das proteínas NS3 (p80) e E^{ms} (E⁰). O ELISA antígeno de captura pode ser realizado no plasma ou em fragmentos do pavilhão auricular. O diagnóstico em plasma não é indicado em animais com idade inferior a três meses, devido à interferência dos anticorpos maternos. Esta técnica tem a vantagem de independar de cultivo celular, não são afetadas pelo

armazenamento prolongado das amostras, que podem ser mantidas congeladas em microtubos sem a utilização de formol (SALIKI; DUBOVI, 2004; DUBOVI, 2013). O ELISA antígeno em amostras de fragmento de orelha tornou-se popular pela consistência de detecção dos animais PI's, independe do *status* de anticorpos dos animais além da facilidade da colheita de amostras (SALIKI; DUBOVI, 2004; DUBOVI, 2013).

A imunohistoquímica é um dos métodos mais populares nos EUA e baseia-se na detecção do antígeno através da análise de tecidos fixados em formol, embebidos em parafina e marcados com anticorpos monoclonais específicos (SALIKI; DUBOVI, 2004). Embora mais laborioso que o ELISA antígeno de captura, este método também pode ser utilizado na detecção de antígenos virais em animais jovens por não sofrer interferência de anticorpos maternos e possuir um custo melhor em relação ao isolamento viral (BRODERSEN, 2014; WALZ et al., 2010).

Os métodos indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos, sendo uma forma valiosa de determinar exposição anterior ao BVDV. O resultado positivo do anticorpo em um animal não vacinado indica exposição anterior ao BVDV. A alta prevalência de animais soropositivos em um rebanho não-vacinado é um indicativo de que existe PI nesta população, enquanto o teste negativo indica que é improvável a existência de PI no rebanho (LANYON et al., 2014).

O ELISA anticorpo é uma alternativa eficiente e econômica em relação à soroneutralização (SN), pois estão disponíveis em kits comerciais. Este teste possui a limitação de sofrer interferência dos anticorpos colostrais (LANYON et al., 2014).

A soroneutralização é a técnica mais frequente utilizada na Europa, pois possibilita a detecção de anticorpos através do soro sanguíneo. Através da SN é possível diagnosticar se o animal foi infectado pelo vírus; se o bezerro possui anticorpos colostrais circulantes, avaliar se houve imunização pós vacinal e se o bezerro foi infectado na vida intra uterina. Esta técnica deve ser realizada em propriedades que não vacinam o rebanho contra o BVDV e em animais com idade superior a 3 meses, devido a dificuldade em diferenciar animais infectados de animais com anticorpos vacinais ou colostrais (DUBOVI, 2013).

Existem diferentes propostas para a detecção dos animais persistentemente infectados. Zimmer et al. (2004) realizaram um estudo avaliando a detecção do RNA do vírus nos leucócitos por meio de RT-PCR e ELISA antígeno. Após a infecção experimental de novilhas com o BVDV-1, os autores detectaram 25 bezerros PI's

por meio do isolamento viral antes da ingestão do colostro. O teste passou a detectar 4/25 positivas na sétima semana de vida e novamente 25/25 animais positivos na décima semana de vida. O ELISA antígeno identificou 24/25 animais antes da colostragem e 10/25 na sétima semana de vida. O RT-PCR foi realizado em 14 animais ao nascimento e 19 após a sétima semana de vida, observando-se positividade no teste de 100% das amostras testadas. O estudo sugere que o isolamento viral e o ELISA antígeno podem apresentar resultados falso-negativos na presença de anticorpos colostrais.

Cornish et al. (2005) comparou as técnicas de imunohistoquímica e ELISA antígeno para a detecção de infecção persistente em amostras de fragmento do pavilhão auricular comparando-as com o isolamento de viral, transcrição reversa (RT) seguida da PCR em amostras de *buffy coat* e contra o BVDV tipos 1a e 2, soroneutralização (SN). Os testes de IHC e ELISA antígeno detectaram 100% de bezerros PI's.

Segundo World Organisation for Animal Health (2015), a detecção do PI deve ser especificamente direcionada para a detecção do vírus ou dos seus componentes (RNA ou antígenos).

Fulton et al. (2009) avaliaram os testes de diagnóstico de BVDV em diferentes tipos de amostras colhidas de 12 bezerros PI's para o vírus BVDV-1a, BVDV-1b e BVDV-2 durante 11 meses no Kansas. Os autores realizaram a titulação viral nas amostras de soro e *swab*; ELISA antígeno de captura no soro, *swab* nasal e amostras frescas de tecido da orelha; RT-PCR em amostras de soro, *swab* nasal e amostras frescas de tecido da orelha; imunohistoquímica em amostras de tecido da orelha fixadas em formol; e testes sorológicos para a titulação de anticorpos. Os testes ELISA antígeno e imunohistoquímica nas amostras de fragmento de orelha apresentaram resultados positivos, assim como o ELISA antígeno e o RT-PCR em amostras de soro. Os resultados demonstram que os PI's podem ser identificados em uma variedade de testes, mas a diferenciação entre PI e infecção transitória necessita testes adicionais especialmente nas amostras de sangue e *swab*.

VanderLey, Ridpath e Sweiger (2011) compararam a utilização do ELISA antígenos em oito diferentes tipos de amostras de 40 animais PI's em Oklahoma. Os animais PI's foram identificados através dos teste de ELISA antígeno em fragmento de orelha e imunohistoquímica. A detecção dos antígenos em amostras de *swab* nasal e de tecido da prega caudal foram 100% sensíveis comparado com amostras

de fragmentos de orelha. Por outro lado, as amostras de soro apresentaram menor sensibilidade em relação ao *swab* nasal. As amostras de *swab* vaginal ou prepucial, de conjuntiva, da cavidade oral e retal apresentaram resultados insatisfatórios para o diagnóstico através do ELISA.

Hanon et al. (2012) compararam a eficiência dos testes RT-PCR e ELISA antígeno em amostras de sangue para diagnóstico de BVDV na Bélgica. Foram analisadas amostras de 4.972 animais com idade superior a três meses de idade. As amostras compostas foram previamente misturadas em volumes iguais de sangue provenientes de 30 animais do mesmo rebanho para a realização da triagem através do *Real time* RT-PCR. Após o resultado positivo, o *pool* era avaliado individualmente através do RT-PCR e ELISA antígeno, os animais positivos foram retestados para a diferenciação entre infecção persistente ou transitória. Todas as amostras positivas no ELISA antígeno foram positivas no RT-PCR. No segundo teste, 17 animais foram identificados PI em ambos os testes e outros 55 foram identificados como negativos e TI. Apesar da semelhança de resultados para PI's, o PCR apresentou maior sensibilidade para a detecção de TI em relação ao ELISA.

**CAPÍTULO 1-ASPECTOS CLÍNICOS, PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS DE
FÊMEAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS PARA O BVDV**

3 INTRODUÇÃO

O Vírus da Diarreia Viral Bovina é um importante agente infeccioso cosmopolita que afeta a produtividade e reprodução dos rebanhos. Recente revisão sistemática de artigos oriundos de 15 países demonstrou que as perdas monetárias diretas ocasionadas pelo BVDV são amplamente variadas, em torno de U\$ 0,50 a U\$ 687,80). Estas perdas estão associadas à mortalidade, morbidade, retardo crescimento, perda de peso, descarte prematuro, natimortos, fertilidade/perdas reprodutivas, abortamentos, queda na produção e qualidade do leite, imunossupressão, perdas entre os animais PI's, re-infecção de rebanhos livres, e tratamento veterinário paliativo (RICHTER et al., 2017). Infelizmente o Brasil não possui levantamentos sobre as perdas monetárias diretas com o BVDV e nem possui programas de controle e/ou erradicação da doença.

O perfil clínico dos bovinos com infecção transitória ou persistente é muito variável, desde um quadro inaparente à intenso, dependendo da cepa do BVDV e fatores associados ao hospedeiro como a idade gestacional do feto, imunocompetência, imunotolerância e estresse ambiental (BAKER, 1995). A diversidade do perfil clínico pode ser atribuída à ampla distribuição do antígeno viral pelos órgãos de animais PI's como o trato gastrointestinal, fígado, pâncreas, pulmões, órgãos linfoides (baço e linfonodos), glândula adrenal, ovários, útero e glândula mamária (SHIN; ACLAND, 2000).

O quadro clínico apresentado pelos animais infectados pelo BVDV geralmente é misto. A Doença das Mucosas é relatada em aproximadamente 5 a 10% dos animais PI's, caracterizada pela destruição do tecido linfóide no trato gastrintestinal (RADOSTITS; LITTLEJOHNS, 1988; LIEBLER-TENORIO, 2005). Banchofen et al. (2010) avaliaram o perfil clínico de 146 PI's infectados por diferentes subgrupos de BVDV-1, por meio de estudo retrospectivo (1995-2003) e prospectivo (2004-2005). A maioria dos casos investigados apresentavam histórico de diarreia (41%), broncopneumonia (20%) ou ambos (9%). Alterações neurológicas foram observadas em 10% das fichas de necropsia. Outras observações menos frequentes relatadas para os animais PI's foram abortamentos, laminites e outras doenças de casco, fraqueza e anemia (BACHOFEN et al., 2010).

O impacto do BVDV na reprodução, produção e qualidade do leite é amplamente apresentada na literatura em rebanhos livres e infectados ou antes e após a instituição de programas de erradicação em países da Europa.

A redução da performance reprodutiva atribuída ao vírus está vinculada à baixa taxa de concepção ao primeiro serviço e aumento do intervalo entre partos, provavelmente pelo baixo número e alterações estruturais nos folículos das regiões corticais dos ovários (ALTAMIRANDA et al., 2013). Além da redução na fertilidade e defeitos congênitos nos fetos, o BVDV é reponsável por 6 a 10% dos abortamentos (GROOMS, 2004; EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Em relação à produção do leite há relatos da perda de 368kg de leite, 9,35kg de proteína e 10,2 kg de gordura por vaca em uma lactação em rebanhos infectados (TIWARI et al., 2007). Além disso, os rebanhos positivos apresentam maior ocorrência de mastite subclínica e maiores contagens de células somáticas (LAUREYNS et al., 2013; TSCHOPP et al., 2017).

As possíveis razões para a diversidade do perfil clínico apresentado pelos animais infectados pelo BVDV têm sido repetidamente investigadas na literatura internacional, especialmente associando as cepas do BVDV, porém a maioria das pesquisas sobre o perfil clínico da BVDV é apresentado para animais transitoriamente infectados. Além disso, não há relatos sobre o histórico reprodutivo e produtivo em vacas persistentemente infectadas. No Brasil, as pesquisas são focadas na histopatologia e virologia com escassez de informações à respeito do perfil clínico, produtivo e reprodutivo seja de animais TI's como PI's, apesar da importância desses dados considerando-se as particularidades dos isolados brasileiros.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil clínico, histórico produtivo e reprodutivo de fêmeas bovinas persistentemente infectadas com o BVDV-2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 5131190216.

4.1 REBANHO E MANEJO SANITÁRIO

Este experimento foi conduzido de Setembro de 2015 a Março de 2017 em uma propriedade leiteira, localizada na cidade de Araras- São Paulo. Neste período, o rebanho era composto por aproximadamente 3.700 animais da raça Holandesa, sendo que 1.750 são vacas em lactação com produção média diária de 38,5 litros de leite.

As bezerras ficavam alojadas em gaiolas suspensas individuais do nascimento ao desmame (aos 75 dias de vida). Posteriormente, as bezerras eram transferidas para lotes coletivos contendo cama de areia, piquetes, bebedouro e dieta total disponibilizada no cocho. As novilhas eram mantidas em lotes maiores de aproximadamente 100 animais, nas mesmas condições até o sétimo mês de gestação. No oitavo mês de prenhez, as novilhas e as vacas secas mudavam para o lote da maternidade com o sistema de ventilação cruzada, com capacidade para 200 fêmeas. Após o parto, as vacas em lactação ficavam instaladas em um barracão de ventilação cruzada de criação intensiva, subdividido em seis lotes compostos por aproximadamente 290 animais (Figura 3).

A imunização do rebanho para o BVDV era realizada por meio da colostragem dos recém nascidos com cinco litros de colostro de boa qualidade previamente testado com o auxílio do colostrômetro nas primeiras 12 horas de vida além de protocolo de vacinação. A vacinação das bezerras ocorria aos 60 dias de vida, com reforço aos 30 dias após a primovacinação, seguida de revacinações semestrais realizadas nos meses de Abril e Outubro. A vacina comercial empregada³ contém as estirpes de BVDV-1 (5960) e BVDV-2 (53637) inativadas; BoHV-1 (Cooper) e BPIV-3 (RLB 103) vivos/termosensíveis; BRSV (375) vivo/atenuado, além de *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona* inativadas, associadas ao Quil A, colesterol, e Amphigen como adjuvantes.

³ Cattle Master Gold FP5 + L5®, Zoetis , São Paulo-SP, Brasil.

Figura 3- Ambiente no qual as fêmeas ficavam alojadas durante o período experimental

(A)

(B)

(C)

Fonte: Sobreira, N.M (2016).

Legenda: (A) Bezerra na fase de aleitamento em gaiola individual e suspensa; (B) Criação de bezerras desmamadas em lotes coletivos; (C) Barracão de ventilação cruzada das vacas em lactação.

4.2 TRIAGEM DOS ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)

4.2.1 Teste imunoenzimático direto

A pesquisa de PI foi realizada por meio de biópsias da extremidade do pavilhão auricular para a obtenção de fragmento com aproximadamente 1,0 cm de

comprimento e 0,5 cm de largura, utilizando-se o assinalador tipo “V”⁴ (Figura 4). As colheitas entre animais foram realizadas após a desinfecção do aparelho com álcool 70%. O material obtido foi acondicionado em microtubos e congelado e encaminhado para o Laboratório Axys em Porto Alegre para a realização do teste imunoenzimático direto⁵, seguindo as instruções do fabricante.

Figura 4- Colheita do material para o teste imunoenzimático direto

(A) Fonte: Torres, F.D. (2015).

(B) Fonte: Gomes, V. (2015).

Legenda: (A) Contenção da bezerra para a colheita de fragmento do pavilhão auricular com o assinalador tipo “V”; (B) Pavilhão auricular após a colheita.

A triagem dos animais P’s foi realizada em quatro etapas. Na etapa 1, 2247 animais foram avaliados, contemplando-se a última geração de fêmeas, vacas em lactação que pariram apenas macho ou aquelas sem descendentes vivos.

Dos animais testados na etapa 1, detectou-se 34 fêmeas infectadas, dos quais 19 eram bezerras com idade entre 0 a 12 meses, sete animais eram novilhas com idade entre 13 e 24 meses e 8 eram animais entre 25 e 36 meses. Destas, trinta fêmeas, foram re-testadas após 30 dias da primeira colheita para diferenciar a infecção entre transitória e persistente. Os quatro animais não testados morreram por doença respiratória ou foram precocemente descartados.

Nesta segunda etapa foi possível identificar que 19/30 animais repetiram o resultado positivo, sendo classificados como PI’s. Os demais (n=11) foram classificados como transitoriamente infectados.

⁴ Walmur®, Porto Alegre, Brasil

⁵ Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus, Idexx®, Maine, EUA

Na terceira etapa, todas as mães vivas dos PI's (n=11) e as mães das bezerras que morreram antes do re-teste (n=4) foram testadas, sendo possível detectar quatro mães PI (4/15) com idade compreendida entre 25 e 36 meses de idade.

A partir deste momento, iniciou-se a etapa 4 com a monitoração da infecção fetal, testando-se todas as bezerras nascidas na fazenda a partir da última PI detectada. Foram detectadas três bezerras PI's (3/103) nos dois primeiros meses após a finalização da triagem do rebanho. Sendo assim, a recontagem dos nove meses após a identificação da última PI foi reiniciada. Após este momento acompanhou-se o nascimento, comprovando-se a negatividade do rebanho

4.2.2 Grupos experimentais

Dos de 26 animais PI's identificados da etapa 1 a 4, 25 fêmeas foram selecionadas para a composição do grupo PI. O grupo controle (n=25) não infectado (NI) eram negativos no teste imunoenzimático direto. Estes animais foram selecionados aleatoriamente de acordo com as faixas etárias pareadas com as fêmeas PI's.

Por meio do controle leiteiro mensal realizado pela Associação do Gado Holandês, tivemos acesso as informações das vacas em lactação quanto aos dias em lactação (DEL), produção de leite (PL) e resultados das amostras para contagem de célula somática (CCS) analisadas no Laboratório da Clínica do Leite-ESALQ. A CCS e PL foram avaliadas durante seis momentos da lactação (M1=10-70; M2=44-99; M3=79-127; M4=107-155; M5=1331-183 e M6=167-218).

O histórico clínico, reprodutivo e produtivos dos animais ficavam armazenados em fichas individuais digitais do mesmo programa de computador. As fêmeas entre 13 a 24 meses não possuíam os dados disponíveis no programa Dairy Comp[®] e o histórico das <12 meses não foram utilizados devido alteração no protocolo de identificação tristeza parasitária bovina, que passou a ser realizado com base no escore de temperatura.

4.2.3 Avaliação dos animais PI's e Controle

Os animais positivos no primeiro teste imunoenzimático direto foram avaliados na data do re-teste, evitando a perda devido descarte precoce geralmente realizado imediatamente após a emissão dos resultados. Os animais NI foram examinados posteriormente, devido ao elevado número de amostras dos PI's.

4.2.4 Escores clínicos

As fêmeas PI's e controle NI foram avaliadas por meio dos escores de doença respiratória e diarreia de acordo com os critérios de pontuação *Calf Heath Scoring Criteria* da *University of Wisconsin - Madison* (McGUIRK, 2008; POULSEN; McGUIRK, 2009). O escore fecal é classificado da seguinte forma: 0- consistência normal, 1- pastosa, semi-formada; 2- pastosa com grande quantidade de água; ou 3- fezes líquidas com conteúdo fecal no períneo e cauda (Quadro 1). A diarreia foi considerada quando os animais apresentaram escores 2 ou 3. O escore de doença respiratória é composto pelos seguintes parâmetros: temperatura retal, tosse, secreção nasal, secreção ocular, posicionamento da cabeça e orelhas. A classificação de 0 a 3 de acordo com a intensidade das manifestações clínicas (Quadro 2). Os animais com a soma dos escores igual a 4 foram classificados como suspeitos e com a pontuação ≥ 5 com doença respiratória.

Quadro 1-Escores de fezes para a detecção de diarreia nas fêmeas PI's e NI's.

Escore	Consistência das fezes
0 Normal: consistência firme
1 Pastosa: semi-formada
2 Pastosa: com maior quantidade de água
3 Líquida: aquosa com conteúdo fecal no períneo e cauda

Fonte: Escore GeCria (2017).

Quadro 2-Escore para a detecção da Doença Respiratória Bovina.

Escore	0	1	2	3
Temperatura retal	37,7-38,2°C	38,3-38,8°C	38,9-39,3°C	≥39,4°C
Tosse	Ausente	Presente e única quando estimulada	Presente e repetida, estimulada ou ocasionais	Presente, repetidas e espontâneas
Secreção Nasal	Serosa	Pouca, unilateral	Excessiva, mucosa, bilateral	Abundante mucopurulenta, bilateral
Secreção Ocular	Serosa	Pouca quantidade	Moderada, quantidade bilateral	Intensa quantidade, bilateral
Posicionamento das orelhas	Normal	Balançar das orelhas ou cabeça	Ligeiramente pendente, unilateral	Pendente intensamente, bilateral ou torção da cabeça

Fonte: Escore GeCria (2017).

4.2.5 Colheita de amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas dos animais foram colhidas por meio de punção da veia jugular externa, utilizando-se sistema a vácuo, após a antissepsia com álcool 70%. Foram obtidas alíquotas de sangue sem anticoagulante e tubos contendo citrato dextrose. Todas as amostras após a colheita foram mantidas refrigeradas até o processamento no laboratório. No laboratório, as amostras dos tubos com Citrato dextrose foram utilizadas para a obtenção do *buffy coat* para posterior identificação e sequenciamento do vírus. Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados para separação do soro, alíquotadas em microtubos, armazenados em freezer a -40°C para posterior determinação da haptoglobina.

4.2.6 Exames laboratoriais

A concentração da haptoglobina sérica foi avaliada através da técnica descrita por Jones & Mould (1984), adaptada por Bastos et al. (2013), usando a capacidade de ligação às moléculas de meta-hemoglobina. Para tanto, foi utilizado um soro controle com concentração conhecida de haptoglobina (59 mg/dL), sendo a curva padrão preparada em diluição seriada. As amostras de soro analisadas em duplicata (10µL) foram diluídas em 90µL de solução fisiológica, sendo adicionados posteriormente 50µL de solução de meta-hemoglobina bovina (30mg/dL) nos poços teste e 50µL de solução salina nos poços referente ao controle de cada amostra. A placa foi mantida em temperatura ambiente e protegida da luz durante 10 minutos, onde foram adicionados 150µL do substrato guaiacol e 50µL de peróxido de hidrogênio (0,02 molar). Após 10 minutos, foi realizada leitura espectrofotométrica com leitor de microplacas⁶, com comprimento de onda de 490 nm.

⁶ BioTek[®] Instruments, Inc., headquartered in Winooski, VT, USA

4.2.6.1 Separação do Buffy Coat para o RT-PCR

Os leucócitos sanguíneos de cada animal foram extraídos a partir de dois tubos com citrato dextrose por meio da centrifugação do sangue a 805g por 10 minutos à 20°C. Posteriormente a camada de plasma foi removida utilizando uma pipeta Pasteur estéril. A camada de *buffy coat* (leucócitos) dos dois tubos, foi retirada cuidadosamente e transferida para um tubo cônico estéril de 15 mL. Os leucócitos foram ressuspensos em 14 mL de Tris-NH₄Cl à 37°C. O tubo cônico foi homogeneizado e incubado por 20 minutos à 37°C para lise das hemácias. Foi realizada a centrifugação dos frascos a 805g por 10 minutos à 20°C. O sobrenadante foi removido gentilmente com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, foram adicionados 5 mL de PBS 1X. O tubo foi agitado com o auxílio do agitador tipo vortex por 5 segundos. O processo de centrifugação foi novamente realizado para a remoção do sobrenadante, em seguida as células foram lavadas duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante desprezado e as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS 1X. A suspensão celular foi aliquoteada em dois microtubos estéreis, centrifugadas por 30 segundos a 17.949g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado, e os dois microtubos foram congelados a -80°C para a análise de RT-PCR.

4.2.6.2 Transcriptase reversa e reação em cadeia da Polimerase (RT-PCR)

As amostras de soro dos animais PI's e NI's foram processadas no Laboratório de Vírus de Bovinos no Instituto Biológico. Para RT-PCR, o RNA foi extraído do buffy-coat. A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante⁷. Os primers utilizados na reação detectaram regiões comuns para BVDV 1, 2 e HoBi-like, com base em uma sequência de 290 nucleotídeos, localizado na região 5' (5' TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC 3' e 5' ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3'), de acordo com Weinstock, Bhudevi & Anthony (2001). Os Amplicons foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo GelRed diluído (1: 150) em água livre de nuclease. A visualização foi realizada utilizando um transiluminador sob luz

⁷ Accessquick PCR Master mix®, Promega Corporation. Madison, WI, USA.

ultravioleta (320 nm). Os fragmentos de DNA foram comparados com os pares de bases padrão apresentando incrementos de 100 pb ⁸.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados qualitativos foram analisados quanto a frequência (%) dos achados. A associação dos grupos experimentais com os escores de diarreia e DRB foram avaliados pelo teste Qui-quadrado. O teste exato de Fisher foi utilizado em casos de baixo número de observações e quando as variáveis eram binárias como os dados do histórico clínico.

Os dados quantitativos foram avaliados quanto a distribuição de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas foram submetidas a transformações numéricas, utilizando-se os seguintes métodos: raiz quadrática, Log₁₀ e inversa.

Na análise geral, a comparação entre grupos (PI x NI) foi realizada através do teste T-Student para as amostras independentes. As comparações entre grupos das variáveis que não passaram pelas transformações foram feitas através do teste de Mann-Whitney U.

As variáveis quantitativas com distribuição normal ou normalizadas foram avaliadas em relação ao efeito da faixa etária pela análise de variância (ANOVA), individualmente em cada grupo experimental (PI x NI), com posterior teste *Post hoc* de Bonferroni. O teste T de Student para amostras independentes avaliou as diferenças dos grupos experimentais dentro de cada faixa etária.

Os parâmetros quantitativos CCS (valores normalizados) e PL foram avaliados em relação ao efeito do tempo (dias em lactação) e grupos experimentais, a variação ao longo do tempo pela análise de variância (ANOVA), dentro de cada grupo experimental e as diferenças entre os grupos pelo teste T de Student para amostras independentes.

As variáveis não paramétricas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis para verificar a diferença entre as faixas etária dentro de cada grupo experimental. Adotou-se o teste de Mann-Whitney para as comparações múltiplas. Este último

⁸ DNA Ladder de 100 pb[®], Invitrogen-Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA.

teste avaliou as diferenças entre os grupos experimentais (PI x NI) dentro de cada faixa etária.

5 RESULTADOS

Este trabalho avaliou os aspectos clínicos e histórico produtivo e reprodutivo de fêmeas bovinas PI para o BVDV-2.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS

O RT-PCR a partir dos leucócitos do sangue detectou 19 amostras positivas para o BVDV-2 e seis amostras negativas (Apêndice A). As amostras positivas foram sequenciadas confirmando-se o genótipo do BVDV-2.

T

5.2 AVALIAÇÃO DOS ESCORES CLÍNICOS

A análise geral dos dados permitiu detectar associação entre os escores de diarreia ($P=0,012$) e DRB ($P=0,004$) com os grupos experimentais (tabela 1).

A frequência de diarreia nas fêmeas PI's foi de 22,7% enquanto que nenhum animal NI apresentava escore fecal 2 ou 3 (Figura 5). A faixa etária apresentou associação com o escore de diarreia para o grupo etário entre 25 a 36 meses de idade, observando-se tendência ($P=0,074$) para maior frequência de diarreia nas fêmeas PI's. A presença de diarreia não variou nas bezerras e novilhas ($P\geq 0,455$).

Em relação a DRB observou-se frequência de 33,3; 8,3; 58,3% de fêmeas positivas, suspeitas e negativas no grupo PI (Figura 6). No grupo NI, as frequências observadas foram de zero, 4 e 96% para positivos, suspeitos e negativos para o DRB.

Tabela 1- Frequências (Número de casos/ observações) de diarreia e Doença Respiratória Bovina (DRB) em fêmeas persistentemente infectadas (PI) e controle não infectadas (NI) com o BVDV-2

	Grupo	Diagnóstico	Geral	<12 meses	13-24 meses	25-36 meses	P-valor
Diarreia	PI	Positivo	22,7(5/22)	12,5(1/8)	20,0(1/5)	33,3(3/9)	0,584
		Negativo	77,3(17/22)	87,5(7/8)	80,0(4/5)	66,7(6/9)	
	NI	Positivo	0(0/25)	0	0	0	-
		Negativo	100(25/25)	100(8/8)	100(6/6)	100(11/11)	
	P-valor		0,012*	0,500	0,455	0,074 †	
DRB	PI	Positivo	33,3(8/24)	37,5(3/8)	20,0(1/5)	36,4(4/11)	0,757
		Suspeito	8,3(2/24)	0	20,0(1/5)	9,1(1/11)	
		Negativo	58,3(14/24)	62,5(5/8)	60,0(3/5)	54,5(6/11)	
	NI	Positivo	0(0/25)	0	0	0	0,331
		Suspeito	4,0(1/25)	12,5(1/8)	0	0	
		Negativo	96,0(24/25)	87,5(7/8)	100(6/6)	100(11/11)	
P-valor		0,004*	0,115	0,231	0,039*		

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda:*Indica diferença estatística ($P \leq 0.05$); † indica tendência estatística (>0.05 e $\leq 0,10$).As diferenças entre grupos PI e NI foram determinadas pelo teste Qui-quadrado; As diferenças entre faixas etárias pelo teste teste exato de Fisher

Figura 5- Frequências (%) geral e em diferentes faixas etárias de diarreia em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) para Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2).

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Figura 6- Frequências (%) geral e em diferentes faixas etárias para Doença Respiratória Bovina (DRB) em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) para o Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2).

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

A análise geral dos parâmetros individuais de DRB, permitiu detectar associação entre a temperatura ($P=0,008$) e secreção nasal ($P=0,064$) com os grupos experimentais (tabela 2).

A faixa etária apresentou associação com a temperatura para o grupo etário entre 25 a 36 meses e tendência estatística ($P=0,084$) para secreção ocular nas fêmeas de 13 a 24 meses. Nos parâmetros individuais da DRB nenhum animal apresentou alterações no posicionamento de orelha e cabeça.

Tabela 2- Frequências (Número de casos/ observações) para os parâmetros respiratórios em fêmeas Persistentemente Infectadas (PI's) e não infectadas (NI) para o BVDV-2.

Parâmetros/	Grupos/	Escore	Geral	<12m	13-24 m	25-36 m	P-valor
Temperatura	PI	0	0 (0/21)	0(0/8)	0(0/5)	0(0/8)	0,318
		1	42,9(9/21)	25,0(2/8)	60(3/5)	50,0(4/8)	
		2	38,1(8/21)	37,5(3/8)	20,0(1/5)	50(4/8)	
		3	19(4/21)	37,5(3/8)	20(1/5)	0(0/8)	
	NI	0	36(9/25)	0(0/8)	33,3(2/6)	63,6(7/11)	0,059†
		1	44(11/25)	75(6/8)	33,3(2/6)	27,3(3/11)	
		2	12(3/25)	12,5(1/8)	33,3(2/6)	0(0/11)	
		3	8(2/25)	12,5(1/8)	0(0/6)	9,1(1/11)	
	P-valor		0,008*	0,135	0,325	0,007*	
Tosse	PI	0	83,3(20/24)	62,5(5/8)	100(5/5)	90,9(10/11)	0,103
		1	12,5(3/24)	25,0(2/8)	0(0/5)	9,1(1/11)	
		2	0(0/24)	0(0/8)	0(0/5)	0(0/11)	
		3	4,2(1/24)	12,5(1/8)	0(0/5)	0(0/11)	
	NI	0	100(25/25)	100(8/8)	100(6/6)	100(11/11)	0,356
		1	0(0/25)	0(0/8)	0(0/6)	0(0/11)	
		2	0(0/25)	0(0/8)	0(0/6)	0(0/11)	
		3	0(0/25)	0(0/8)	0(0/6)	0(0/11)	
	P-valor		0,103	0,158		0,306	
Secreção Nasal	PI	0	58,3(14/24)	75,0(6/8)	60,0(3/5)	45,5(5/11)	0,421
		1	20,8(5/24)	12,5(1/8)	40,0(2/5)	18,2(2/11)	
		2	12,5(3/24)	0(0/8)	0(0/5)	27,3(3/11)	
		3	8,3(2/24)	12,5(1/8)	0(0/5)	9,1(1/11)	
	NI	0	88,0(22/25)	100(8/8)	83,3(5/6)	81,8(9/11)	0,446
		1	12,0(3/25)	0(0/8)	16,7(1/6)	18,2(2/11)	
		2	0(0/25)	0(0/8)	0(0/6)	0(0/11)	
		3	0(0/25)	0(0/8)	0(0/6)	0(0/11)	
	P-valor		0,064†	0,319	0,387	0,162	
Secreção Ocular	PI	0	45,8(11/24)	50,0(4/8)	20,0(1/5)	54,5(6/11)	0,215
		1	33(8/24)	12,5(1/8)	40,0(2/5)	45,5(5/11)	
		2	16,7(4/24)	25,0(2/8)	40,0(2/5)	0(0/11)	
		3	4,2(1/24)	12,5(1/8)	0(0/5)	0(0/11)	
	NI	0	60,0(15/25)	37,5(3/8)	83,3(5/6)	63,6(7/11)	0,211
		1	40,0(10/25)	62,5(5/8)	16,7(1/6)	36,4(4/11)	
		2	0(0/25)	0(0/8)	0(0/6)	0(0/11)	
		3	0(0/25)	0(0/8)	0(0/6)	0(0/11)	
	P-valor		0,121	0,121	0,084†	0,665	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda:*Indica diferença estatística ($P \leq 0.05$); † indica tendência estatística (>0.05 e $\leq 0,10$). As diferenças entre grupos e entre as faixas etárias PI e NI foram determinadas pelo teste Qui-quadrado.

5.3 HISTÓRICO CLÍNICO DO REBANHO

Os animais em lactação (PI=8 e NI=11) tiveram suas fichas clínicas avaliadas através do levantamento de dados no programa DairyComp® para a análise da ocorrência de doenças durante a lactação (Tabela 3 e Figura 7).

Em relação a presença de doenças no pós-parto observou-se diferença entre os grupos experimentais ($P=0,007$) e tendência estatística ($P=0,058$) para a ocorrência de Metrite.

Tabela 3-Frequências (%) e valores absolutos para doenças durante o período pós-parto em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e não infectadas (NI) para o BVDV-2

Doenças		PI(n=8)	NI(n=11)	P-valor
Metrite	Presente	37,5 (3/8)	0(0/11)	0,058†
	Ausente	62,5(5/8)	100(11/11)	
Edema mamário	Presente	0(0/8)	18,2(2/11)	0,322
	Ausente	100(8/8)	81,8(9/11)	
Retenção dos Anexos Fetais	Presente	25(2/8)	0(0/11)	0,183
	Ausente	75(6/8)	100(11/11)	
Cetose	Presente	12,5(1/8)	0(0/11)	0,421
	Ausente	87,5(7/8)	100(11/11)	
Mastite Clínica	Presente	50(4/8)	27,3(3/11)	0,297
	Ausente	50(4/8)	72,7(8/11)	
Doença Respiratória Bovina	Presente	12,5(1/8)	0(0/11)	0,421
	Ausente	87,5(7/8)	100(11/11)	
Doença no pós-parto	Presente	100(8/8)	36,4(4/11)	0,007*
	Ausente	0(0/8)	63,6(7/11)	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda:*Indica diferença estatística ($P \leq 0.05$); † indica tendência estatística (>0.05 e $\leq 0,10$) entre os grupos experimentais. As diferenças entre grupos e entre as faixas etárias PI e NI foram determinadas pelo teste exato de Fisher.

Figura 7-Frequências (%) das doenças durante o período pós-parto em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e não infectadas (NI) para o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

5.4 BIOMARCADOR INFLAMATÓRIO HAPTOGLOBINA

Os valores médios e desvios-padrão para Hp estão apresentados na tabela 4 e Figura 8. O teor máximo de Hp foi observado nos animais com idade entre 13 a 24 meses no grupo PI. No NI, os teores de Hp diminuíram com a idade.

Em relação aos grupos experimentais observou-se maiores concentrações de Hp nas fêmeas entre 25 e 36 meses ($P=0,017$). A comparação dos valores de Hp por faixa etária por grupo demonstrou variações em cada grupo (PI $P=0,017$ e NI $P=0,002$).

Tabela 4-Valores médios e desvios-padrão do biomarcador Haptoglobina (HP) Persistentemente Infectados (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.

Parâmetros	Grupo (N)	Geral	Faixas etária			P-valor
			<12 meses	13-24 meses	25-36 meses	
HP	PI (25)	1,44±0,34	1,51±0,22 ^{ab}	1,70±0,44 ^a	1,24±0,25 ^b	0,017*
	NI(25)	1,26±0,43	1,42±0,32 ^a	1,65±0,51 ^a	0,97±0,24 ^b	0,002*
	P-valor	0,121	0,512	0,891	0,017*	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda:* Indica diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA e Post hoc Bonferroni. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças.

Figura 8 - Valores médios e desvios-padrão para haptoglobina em fêmeas Persistentemente Infectadas (PI) e não infectadas (NI) BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais pelo Teste T.de Student

5.5 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E PRODUÇÃO DE LEITE

Para a avaliação dos dados produtivos foram considerados os dias em lactação (DEL), produção leiteira e CCS das fêmeas PI e NI em seis momentos em que foram monitorados no controle leiteiro pela fazenda.

A média dos dias em lactação foram iguais entre os grupos experimentais na análise geral e por faixa etária., apresentados na Tabela 5 e Figura 9

Os dados de produção de leite (PL) em litros foram diferentes entre os grupos experimentais em todos os pontos de avaliação no ciclo de lactação ($P < 0,05$). A produção de leite no grupo NI foi maior em relação ao grupo PI).Em relação a contagem de célula somática (CCS), o grupo NI apresentou os menores valores para este parâmetro em todos os momentos de avaliação em relação aos PI's. As diferenças foram observadas nos cinco primeiros momentos ($P \leq 0,008$), enquanto entre 167 a 218 dias de lactação observou-se tendência ($P = 0,066$).

Tabela 5-Médias e desvios-padrão para as variáveis dias em lactação (DEL), produção de leite (PL), contagem de células somáticas (CCS) do início (10-70 dias) ao final da lactação (167-218) em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e Não Infectadas (NI) com BVDV-2

Variáveis	Grupos	Momentos (DEL)						P-valor
		1 (10-70)	2 (44-99)	3 (79-127)	4(107-155)	5(131-183)	6(167-218)	
PL	PI(N=4-8)	29,1±6,3	27,8±5,8	29,1±3,5	28,3±4,4	25,8±7,1	26,0±2,8	0,853
	NI (N=10-11)	37,3±6,0	42,6±7,0	43,7±8,3	43,4±9,0	44,0±6,6	42,9±7,5	0,308
	P-valor	0,011*	0,000*	0,000*	0,004*	0,000*	0,001*	
CCS(x10 ⁵)	PI(N=4-8)	2,0±2,3	3,3±3,8	5,6±5,2	10,5±9,7	9,2±9,8	10,5±11,6	0,458
	NI(N=10-11)	0,4±0,4	0,5±0,7	0,4±0,6	3,4±8,4	0,2±0,2	0,3±0,1	0,542
	P-valor	0,008*	0,002*	0,001*	0,005*	0,000*	0,066†	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: *P≤0,05; † tendência (P>0,05 e ≤0,10); Análise no tempo pelo teste de variância (one-way ANOVA); Análise entre grupos pelo Teste T de Student .

Figura 9- Médias e desvios-padrão dos dias em lactação (DEL), produção de leite (PL), contagem de células somáticas (CCS) em vacas Persistentemente Infectadas (PI) e Não Infectadas (NI) com BVDV-2

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais; † Indica tendência entre os grupos ($P > 0,05$ e $\leq 0,10$) pelo Teste T. M1=10-70 dias; M2= 44-99 dias; M3=79-127 dias; M4=107-155 dias; M5= 131-183 dias e M6=167- 218 dias.

5.6 DADOS REPRODUTIVOS

O histórico da vida reprodutiva das vacas PI e NI foi levantado no programa DairyComp[®]. A idade à primeira inseminação nas fêmeas NI foi mais precoce ($14,02 \pm 0,85$) que nas fêmeas PI ($15,59 \pm 1,42$) ($P=0,001$). Além disso, o número de IA's até a primeira prenhez foi maior nas animais PI's (4,0) que as NI's (2,0) ($P=0,058$) (Tabela 6 e Figura 10).

Tabela 6-Média e desvio-padrão da idade na primeira Inseminação Artificial (IA), mediana (valores máximo e mínimo) do número de inseminações até a primeira prenhez em fêmeas bovinas Holandeses persistentemente infectados (PI) e bovinos não infectados (NI).

Dados reprodutivos	PI (N=14)	NI(N=16)	P-valor
Idade na primeira IA	$15,59 \pm 1,42$	$14,02 \pm 0,85$	0,001*
Número de IA até a primeira prenhez (mín-max)	4,00(1-11)	2,00(1-6)	0,058 †

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença estatística ($p \leq 0,05$); † Indica tendência estatística ($P > 0,05$ e $\leq 0,10$) entre os grupos experimentais. Para a idade na primeira inseminação artificial foi usado o teste T de Student e para o número de inseminações artificiais até a primeira prenhez o teste Mann-Whitney U.

Figura 10 Média e desvio-padrão da idade na primeira Inseminação Artificial (IA), mediana do número de inseminações até a primeira prenhez em fêmeas bovinas Holandeses persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou os aspectos clínicos fêmeas bovinas persistentemente infectadas para o BVDV, assim como o histórico produtivo e reprodutivo.

O genótipo de BVDV encontrado no rebanho foi o tipo 2 em todas as fêmeas PI's positivas no RT-PCR. Este achado é muito interessante porque a maioria das cepas caracterizadas no Brasil são do tipo 1 (53,9%) em relação ao BVDV-2 (33,7%) e *HoBi-like* (12,4%) (SILVEIRA et al., 2017). Em outros países também é relatado o predomínio das cepas de BVDV-1 (74%) em relação ao BVDV-2 (26%) nos rebanhos (FULTON et al., 2005). Devido ao predomínio do BVDV-1, as vacinas brasileiras continham apenas esse genótipo. A fazenda no qual foi desenvolvida esta pesquisa usou vacina contendo o BVDV-1 durante décadas, sendo o protocolo modificado apenas em 2012 com a introdução de vacina contendo ambos os genótipos do BVDV. O rebanho da fazenda era aberto com a inserção de animais comprados da região do Paraná, além disso algumas novilhas e vacas eram encaminhadas para uma central de colheita de embrião na mesma região. Os embriões eram implantados em diferentes receptoras oriundas de propriedades que não realizavam o controle do BVDV. Após o nascimento, a metade das bezerras oriundas desta parceria eram enviadas para a fazenda de origem das vacas doadoras dos embriões. Dentre as fêmeas PI's, ao menos uma delas era oriunda de propriedade parceira.

O perfil clínico das fêmeas PI's foi estabelecido por meio dos escores de de escore de fezes e doença respiratória, seguindo os procedimentos descritos por Mc Guirk (2008) e Poulsen e Mc Guirk (2009), respectivamente, somados à análise do histórico dos animais em lactação levantado no programa *DairyComp*. O histórico dos animais não lactantes infelizmente não eram rotineiramente transferidos do caderno de anotação para o programa, o que impossibilitou a análise destes dados.

As fêmeas PI's apresentaram uma maior prevalência de diarreia e de DRB, especialmente nos animais entre 25-36 meses. Esses dados contradizem o perfil etário para diarreias em animais não infectados para o BVDV, geralmente a maior frequência de diarreias é observada em bezerras com idade entre 7 a 14 dias, de acordo com Novo et al. (2017). A PI mais jovem identificada nesta pesquisa possuía 33 dias de vida, não sendo possível afirmar sobre a frequência de diarreias em neonatos PI's.

Existem indícios de que rebanhos que continham animais PI's apresentavam maior taxa de mortalidade por enterites (BOOKER et al., 2008). A diarreia isolada é mais frequentemente observada (41%) que a Doença das Mucosas (5-10%) nos animais PI's, síndrome caracterizada por hipertermia, anorexia, enterite catarral, enterite hemorrágica, enterite fibronecrótica, necrose das Placas de Peyer, além de lesões ulcerativas nas narinas, cavidades nasal, oral, esôfago, rúmen, omaso, abomaso, intestinos e ceco (LIEBLER-TENORIO et al., 2000; LIEBLER-TENORIO, 2005).

O BVDV-2 foi detectado no intestino delgado e grosso de animais PI's (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2004), sendo esse um indício de que o BVDV pode ser um agente primário nos casos de diarreia. Infecção experimental demonstrou hiperplasia e atrofia das mucosas, além de depleção da Placa de Peyer com perda completa da arquitetura e presença de lesões vasculares em animais PI's manifestando DM (LIEBLER-TENORIO et al., 2000). Nos animais PI's aparentemente saudáveis não foram observadas diferenças morfológicas dos folículos linfóides da Placa de Peyer do jejuno ou aspecto macroscópico dos órgãos (TEICHMANN; LIEBLER-TENORIO; POHLENZ, 2000). Nos animais transitoriamente infectados observa-se depleção marcante dos tecidos linfóides (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2004).

A diarreia foi relatada em animais PI's com o BVDV-1 (BACHOFEN et al., 2010). Este achado também foi relatado para os animais transitoriamente infectados pelo BVDV-2 NCP (WALZ et al., 1999; FLORES et al., 2000; BRUM et al., 2002; WOOD et al., 2004; COURTENAY et al., 2007; RIDPATH et al., 2013), porém não foram encontradas pesquisas sobre a presença de diarreias em PI's infectados pelo BVDV-2. Em geral, esta pesquisa observou prevalência geral de 22,7% de diarreia em PI's infectados com o BVDV-2, sendo este índice epidemiológico maior nas fêmeas entre 25 e 36 meses de idade (33%). A prevalência de diarreias dos PI's desta pesquisa é inferior ao índice de 41% relatado por Bachofen et al. (2010).

Em geral, a prevalência de doença respiratória entre os PI's observada nesta pesquisa foi de 33,3% para positivos e 8,3% para suspeitos. A prevalência de DRB também foi maior nos animais com idade inferior a um ano (37,5%) e 25 a 36 meses de idade (36,4%). Estes índices são um pouco maiores que o índice de 29% relatado por Bachofen et al. (2010).

Em relação a análise geral dos parâmetros individuais da DRB, a prevalência de temperaturas $\geq 39,4^{\circ}\text{C}$ ocorreu grupo PI, observando-se em 19% das fêmeas. Em relação a faixa etária metade das fêmeas PI's entre 25 a 36 meses apresentaram temperatura entre 38,9 e 39,3 $^{\circ}\text{C}$. A secreção nasal foi mais frequente no grupo PI em relação ao NI, sendo que 20,8% apresentava secreção serosa unilateral, 12,5% secreção mucosa bilateral e 8,3% secreção mucopurulenta bilateral. A secreção ocular moderada e intensa bilateral ocorreu em 80% dos animais PI entre 13 e 24 meses.

Dentre as principais manifestações clínicas na DRB em animais com infecção persistente e transitória por BVDV estão secreção nasal, tosse esporádica, dispnéia e hipertermia (FLORES et al., 2000; BRUM et al., 2002; MULLER DOBLIES et al., 2004; WOOD et al., 2004; COURTENAY et al., 2007; RIDPATH et al., 2010).

A doença respiratória também é um achado frequente nas infecções pelo BVDV tanto em animais transitoriamente quanto persistentemente infectado (FLORES et al., 2000; BRUM et al., 2002; COURTENAY et al., 2007; BACHOFEN et al., 2010). A principal via de entrada do BVDV é o trato respiratório, além disso o antígeno do BVDV foi detectado tanto no trato respiratório superior quanto inferior (SHIN; ACLAND, 2000; LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2004). O material genético do BVDV foi previamente detectado por meio de lavado trans-traqueal em animais de abatedouro ou necropsiados (FULTON et al., 2000; WEINSTOCK; BHUDEVI; ANTHONY, 2001).

A propriedade onde esta pesquisa foi realizada apresentava elevada taxa de doença respiratória, motivo pelo qual foi realizado lavado transtraqueal em 10 bezerras entre 45 e 60 dias de vida. No lavado transtraqueal destes animais foi detectado material genético do BVDV em duas bezerras, sendo uma delas futuramente identificada como PI. Nestes animais, a infecção pelo BVDV estava associada com *Pasteurella multocida* (BASQUEIRA et al., 2017).

O papel do BVDV na etiopatogenia da DRB não está completamente elucidado. A infecção dos leucócitos do trato respiratório pelo BVDV possui efeito supressivo, o que predispõe às infecções pela *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* (FULTON et al., 2000). Por outro lado, outros autores enfatizam que o vírus é capaz de promover alterações no epitélio respiratório.

A ocorrência de doenças, especialmente metrite e mastite, durante o período pós-parto foi maior nas vacas PI em relação ao grupo NI. A maior ocorrência de

mastite nas PI's é compatível com os dados de CCS e produção, pois a diferença de produção entre os PI's e NI's variou de 8,2 a 18,2 litros de leite em diferentes fases da lactação. A CCS das NI's era de $0,2-3,4 \times 10^5$ e das PI's era de $2-10,5 \times 10^5$ células/mL. É importante ressaltar que a queda na produção de leite e aumento da CCS foi gradual ao longo da lactação. Na literatura não foram encontrados dados produtivos específicos e individuais de animais PI's, no entanto, a maior celularidade, menor produção de leite e maior ocorrência de mastite subclínica e clínica têm sido relatada em rebanhos soropositivos para o BVDV, especialmente antes e após a instituição dos programas de controle e erradicação na Europa (WAAGE et al., 2000; TIWARI et al., 2007; BERENDS et al., 2008; LAUREYNS et al., 2013; TSCHOPP et al., 2017).

As proteínas de fase aguda têm sido utilizadas como biomarcadores do processo inflamatório, especialmente a haptoglobina e amilóide sérica A nos bovinos (MULLER-DOBLIES ET AL., 2004). No presente estudo, observou-se maiores concentrações de haptoglobina nas fêmeas do grupo PI's entre 25 a 36 meses de idade, no qual foram detectadas maiores frequências de diarreia e DRB. Além disso, a maioria dos animais desta faixa etária eram lactantes manifestando doenças pós-parto e maiores valores de CCS.

Muller-Doblies et al. (2004) relataram que a infecção experimental de bezerros com o BVDV NCP estava associada com hipertermia, descarga nasal, tosse esporádica, leucopenia e aumento da haptoglobina entre 8 e 11 dias após a infecção.

Em relação à idade na primeira inseminação, as novilhas PI's apresentaram idade superior que as fêmeas NI's. Algumas propriedades leiteiras fazem o monitoramento da taxa de crescimento dos animais jovens, principalmente porque a idade em que novilhas apresentam o primeiro cio ou alcançam a puberdade está diretamente relacionada com o peso vivo do animal. É desejado que as novilhas apresentem ao menos 40 e 50% de seu peso corporal adulto no momento da inseminação. A recomendação de Morton, Larcombe & Little (2003) é de que as novilhas leiteiras apresentem o peso de aproximadamente 300kg no momento do primeiro serviço.

O início das inseminações onde esta pesquisa foi realizada iniciava-se entre 12 e 13 meses de idade, com peso aproximado de 350 kg e 1,20 de altura de cernelha. Provavelmente as fêmeas PI's (15,59 meses) foram inseminadas mais

tardiamente que as NI's (14,02 meses de idade), provavelmente por atraso no desenvolvimento. Stokstad & Loken (2002) relataram que os bezerros PI's filhos de novilhas submetidas à infecção experimental durante a gestantes, eram pequenos, leves e com retardo no crescimento, em relação aos outros bezerros não infectados. No histórico das PI's triadas nesta pesquisa haviam anotações para não inseminar as novilhas pois eram fracas e pequenas.

O número de inseminações até a primeira prenhez foi maior nas fêmeas PI's que NI's. Foi necessário o dobro de inseminações nas fêmeas PI's (4 doses) em relação às NI's (2 doses) até a 1ª prenhez.

A menor taxa de fertilidade das PI's pode ser justificada pela presença do BVDV nos ovários e útero. Altamiranda et al. (2013) identificaram BVDV NCP em todo o tecido ovariano de animais PI com alterações nas populações foliculares dos ovários, o que afetou diretamente o mecanismo de formação dos embriões observando-se baixas taxas de clivagem e desenvolvimento.

Grooms, Ward e Brock (1996) avaliaram as diferenças morfológicas nos ovários de seis vacas PI's comparando-as com seis vacas não infectadas por meio de cortes histológicos. As vacas persistentemente infectadas com BVDV parecem ter hipoplasia ovariana e alterações morfológicas significativas no número de folículos terciários, graafianos, atresícos, corpo lúteo hemorrágico e corpo albicans. Fray et al. (2000) sugeriram que o BVDV compromete a função ovariana através de três mecanismos: 1) BVDV pode afetar a função gonadotrófica da pituitária; 2) BVDV suprime o nível de estrógeno plasmático afetando a ovulação e o estro; 3) BVDV induz a leucopenia generalizada, afetando a população de leucócitos dos ovários, que interfere na dinâmica folicular.

Em geral, as fêmeas PI's adultas manifestaram maior intensidade de doenças em relação às PI's mais jovens e NI's, especialmente diarreias, DRB e doenças pós-parto. A infecção pelo BVDV e/ou doenças concomitantes podem ter afetado diretamente a produção de leite, a qualidade do leite e a fertilidade das novilhas e vacas.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) as fêmeas PI's apresentaram maior prevalência de diarreia e Doença Respiratória Bovina. Além disso, a análise do histórico da fazenda permitiu verificar maior ocorrência de doenças pós-parto nas fêmeas PI's;
- b) a concentração do biomarcador inflamatório haptoglobina foi maior nas fêmeas PI's com idade entre 25 a 36 meses;
- c) as novilhas PI's apresentaram maior idade à primeira inseminação, assim como maior número de inseminações até a 1^a prenhez;
- d) as vacas PI's apresentaram menor produção de leite associada à maior contagem de células somáticas em diferentes fases da lactação.

REFERÊNCIAS

- ALTAMIRANDA, E. A. G.; KAISER, G. G.; MUCCI, N. C.; VERNA, A. E.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C. Effect of bovine viral diarrhea virus on the ovarian functionality and in vitro reproductive performance of persistently infected heifers. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 326–332, 2013.
- BACHOFEN, C.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; STALDER, H.; PETERHANS, E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 3–4, p. 258–267, 2010.
- BAKER, J. C. The Clinical Manifestations of Bovine Viral Diarrhea Infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425–445, 1995.
- BASQUEIRA, N. S.; MARTIN, C. C.; FRANÇA, J.; OKUDA, L. H.; PITUCO, M. E.; BATISTA, C. F.; MARIA, A.; PAIVA, M.; GOMES, V. Bovine Respiratory Disease (BRD) Complex as a Signal for Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Presence in the Herd. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 55, p. 1–6, 2017.
- BASTOS, B. L.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J. T.; GUEDES, M. T.; VALE, V. L.; MOURA-COSTA, L. F.; MEYER, R. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 254, 2013.
- BERENDS, I. M. G. A.; SWART, W. A. J. M.; FRANKENA, K.; MUSKENS, J.; LAM, T. J. G. M.; VAN SCHAIK, G. The effect of becoming BVDV-free on fertility and udder health in Dutch dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 84, n. 1–2, p. 48–60, 2008.
- BOOKER, C. W.; ABUTARBUSH, S. M.; MORLEY, P. S.; GUICHON, P. T.; WILDMAN, B. K.; JIM, G. K.; SCHUNICHT, O. C.; PITTMAN, T. J.; PERRETT, T.; ELLIS, J. A.; APPELYARD, G.; HAINES, D. M. The effect of bovine viral diarrhea virus infections on health and performance of feedlot cattle. **The Canadian veterinary journal** v. 49, n. 3, p. 253–260, 2008.
- BRUM, M. C. S.; SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; BARROS, C. S. L. de; LANGOHR, I. M. Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da diarréia viral bovina tipo 2 (BVDV-2). **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 813–820, 2002.
- COURTENAY, A. E.; HENDERSON, R. G.; CRANWELL, M. P.; SANDVIK, T. BVD virus type 2 infection and severe clinical disease in a dairy herd. **Veterinary Record**, v. 160, n. 20, p. 706–707, 2007.

FLORES, E. F.; GIL, L. H. G. V; BOTTON, S. A.; WEIBLEN, R. Clinical , pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. v. 77, 2000.

FRAY, M. D.; PATON, D. .; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 615–627, 2000.

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

EVERMANN, J. F.; BARRINGTON, G. M. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell Publishing, 1a ed., cap.6, p. 105-120, 2005.

GROOMS, D.L.; WARD, L. AA.; BROOK, K.V., Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **American Journal Veterinary Research**. v.57, p.830-833, 1996.

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

JONES G.E.; MOULD D.L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobulins to a microtitration plate system. **Research Veterinary Science**.v. 37, p. 87- 92, 1984.

LAUREYNS, J.; PIEPERS, S.; RIBBENS, S.; SARRAZIN, S.; DE VLIEGHER, S.; VAN CROMBRUGGE, J. M.; DEWULF, J. Association between herd exposure to BVDV-infection and bulk milk somatic cell count of Flemish dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 1–2, p. 148–151, 2013.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; LANWEHR, A.; GREISER-WILKE, I.; LOEHR, B. I.; POHLENZ, J. Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 1–2, p. 163–174, 2000.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIDPATH, J. E.; NEILL, J. D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic investigation**, v. 16, n. 5, p. 388–396, 2004.

LIEBLER-TENORIO, E. M. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell Publishing, 1a ed., cap. 7, p. 121-135, 2005.

MCGUIRK, S. M. Disease management of dairy calves and heifers. **Veterinary Clinics of North America**, food animal practice, v. 24, n.1, p. 139-156, 2008.

MORTON, J.; LARCOMBE, M.; LITTLE, S. The In calf book for Dairy Farmers. Dairy Australia, Melbourne, 2003.

NOVO, S. M. F.; COSTA, J. F. dos R.; BACCILI, C. C.; SOBREIRA, N. M.; SILVA, B. T.; DE OLIVEIRA, P. L.; HURLEY, D. J.; GOMES, V. Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 97–104, 2017.

POULSEN, K. P.; MCGUIRK, S. M. Respiratory disease of the bovine neonate. **Veterinary Clinics of North America**: food animal practice, v. 25, p. 121–137, 2009.

RADOSTITS, O. M.; LITTLEJOHNS, I. R. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. **The Canadian Veterinary Journal**. La revue vétérinaire canadienne, v. 29, n. 6, p. 513–28, 1988.

RICHTER, V.; LEBL, K.; BAUMGARTNER, W.; OBRITZHAUSER, W.; KÄSBOHRER, A.; PINIOR, B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Journal**, v. 220, n. June 2016, p. 80–87, 2017.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America**: Food Animal Practice, v. 26, p. 105-121, 2010.

RIDPATH, JULIA F, FALKENBERG, S. M.; BAUERMANN, F. V; VANDERLEY, B. L.; DO, Y.; EDUARDO, F.; RODMAN, D. M.; NEILL, J. D. Comparison of acute infection of calves exposes to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhea virus or a HoBi-like virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 3, p. 438–442, 2013.

SHIN, T.; ACLAND, H. Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 2, n. 2, p. 81–84, 2001.

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**, n. May, p. 1–8, 2017.

STOKSTAD, M.; LOKEN, T. Pestivirus in cattle: Experimentally induced persistent infection in calves. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n. 10, p. 494–501, 2002.

TEICHMANN, U.; LIEBLER-TENORIO, E. M.; POHLENZ, J. E. Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal disease in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 2, p. 174–182, 2000.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P.; TREMBLAY, R.; SCOTT, H. M.; WHITING, T. Production Effects of Pathogens Causing Bovine Leukosis, Bovine Viral Diarrhea, Paratuberculosis, and Neosporosis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 659–669, 2007.

TSCHOPP, A.; DEISS, R.; ROTZER, M.; WANDA, S.; THOMANN, B.; SCHÜPBACH-REGULA, G.; MEYLAN, M. A matched case-control study comparing udder health, production and fertility parameters in dairy farms before and after the eradication of Bovine Virus Diarrhoea in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 144, p. 29–39, 2017.

WAAGE, S. Influence of new infection with bovine virus diarrhoea virus on udder health in Norwegian dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 43, p. 123–135, 2000.

WALZ, P. H.; BELL, T. G.; STEFICEK, B. A.; KAISER, L.; MAES, R. K.; BAKER, J. C. Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 505–514, 1999.

WEINSTOCK D.; BHUDEVI B. ; ANTHONY E.C. Single-tube single-reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology** . v.39, n.1, p.343-346, 2001.

WOOD, R. D.; GOENS, D.; CARMAN, P. S.; DEREGT, D.; JEFFERSON, B.; JACOBS, R. M. Effect on hematopoietic tissue of experimental infection of calves with noncytopathic type 2 bovine viral diarrhea virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 1, p. 42–48, 2004.

CAPÍTULO 2- RESPOSTA IMUNE INATA E ESPECÍFICA PARA AS VIROSES RESPIRATÓRIAS DE FÊMEAS PI'S

8 INTRODUÇÃO

O BVDV infecta praticamente todas as células do sistema imune inato e adaptativo, como os granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, subpopulações de linfócitos T e B (CHASE et al., 2015).

Em relação ao sistema imune inato, Thakur et al. (2014) relataram que a exposição de neutrófilos *in vitro* ao BVDV não citopáticos ou citopáticos diminuiu a expressão dos receptores CD18 (CD11) e CD62L, moléculas que possuem a função de adesão celular ao endotélio para a diapedese dos neutrófilos. Sendo assim, a infecção pelo BVDV pode inibir a migração de neutrófilos do sangue aos tecidos. Os neutrófilos expostos ao BVDV também apresentaram maior expressão do receptor CD14. O CD14 é parte do receptor de tipo de *toll-like 4* (TLR-4), cuja função é o reconhecimento de bactérias Gram-negativas. Nos neutrófilos a expressão deste receptor é induzida pela sua exposição aos PAMP's. A ligação ao receptor CD14 aos PAMP's resulta em resposta inflamatória. A resposta inflamatória associada à redução da diapedese podem exacerbar qualquer doença após as infecções (CHASE et al., 2015).

Os animais PI's são imunotolerantes para a cepa de BVDV NCP, devido a imaturidade do sistema imune no momento da infecção fetal (40-120 dias de gestação), sendo assim são incapazes de reconhecer os antígenos virais como não próprios. Devido à imunotolerância não ocorre a estimulação e proliferação de linfócitos B e T e, como consequência, o animal PI é incapaz de produzir anticorpos específicos contra o vírus (POTGIETER, 1995).

Os animais PI frequentemente morrem prematuramente de doenças do trato respiratório ou outras doenças, devido a alta da susceptibilidade aos agentes infecciosos (POTGIETER, 1997). As manifestações de febre, broncopneumonia, diarreia, abortos e mortes repentinas ocorrem em todas as idades e as lesões no trato digestivo são comuns nos animais com Doença das Mucosas (CAMPBELL et al., 2004). As consequências clínicas induzidas pela imunossupressão do BVDV dependem do ambiente, do estresse, do manejo e de infecções intercorrentes (POTGIETER, 1995). Relatos de infecções secundárias em animais infectados com o BVDV têm sido constante. O vírus é capaz de potencializar uma variedade de doenças incluindo a Salmonelose, Rotaviruse, Coronaviruse, estomatites, Colibacilose e Doença Respiratória Bovina (CAMPBELL et al., 2004).

As alterações do perfil hematológico apresentado pelos animais infectados pelo BVDV, têm sido repetidamente investigadas na literatura internacional, especialmente associando as cepas do vírus, porém a maioria dessas pesquisas são apresentadas para animais transitoriamente infectados. Além disso, apenas um artigo foi encontrado sobre a atividade funcional dos granulócitos em animais persistentemente infectados, ressaltando a importância desses dados considerando-se as alterações na resposta imune inata e a produção de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil hematológico, a atividade funcional dos granulócitos e a produção de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias em fêmeas persistentemente infectadas para o BVDV-2.

9 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 5131190216.

9.1 REBANHO E MANEJO SANITÁRIO

Este experimento foi conduzido de Setembro de 2015 a Março de 2017 em uma propriedade leiteira, localizada na cidade de Araras- São Paulo. No período de desenvolvimento desta pesquisa, o rebanho era composto por aproximadamente 3.700 animais da raça Holandesa, sendo que 1.750 eram vacas em lactação com produção média diária de 38,5 litros de leite.

As bezerras ficavam alojadas em gaiolas suspensas individuais do nascimento ao desmame (aos 75 dias de vida). Posteriormente, as bezerras eram transferidas para lotes coletivos contendo cama de areia, piquetes, bebedouro e dieta total disponibilizada no cocho. As novilhas eram mantidas em lotes maiores de aproximadamente 100 animais, nas mesmas condições até o sétimo mês de gestação. No oitavo mês de prenhez as novilhas e as vacas secas mudavam para o lote da maternidade com o sistema de ventilação cruzada, com capacidade para 200 fêmeas. Após o parto, as vacas em lactação ficavam instaladas em um barracão de ventilação cruzada de criação intensiva, subdividido em seis lotes compostos por aproximadamente 290 animais cada.

A imunização do rebanho para o BVDV era realizada por meio da colostragem dos recém nascidos com cinco litros de colostro de boa qualidade previamente testado com o auxílio do colostrometro nas primeiras 12 horas de vida, além da vacinação. A vacinação das bezerras iniciava-se aos 60 dias de vida com reforço aos 30 dias após a primovacinação, seguida de revacinações semestrais realizadas nos meses de Abril e Outubro. A vacina comercial empregada⁹ contém as estirpes de BVDV-1 (5960) e BVDV-2 (53637) inativadas; BoHV-1 (Cooper) e BPI3-V (RLB 103) vivos/termosensíveis; BRSV (375) vivo/atenuado, além de *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona* inativadas, associadas ao Quil A, colesterol, e Amphigen como adjuvantes.

⁹ Cattle Master Gold FP5 + L5®, Zoetis , São Paulo-SP, Brasil.

9.2 TRIAGEM DOS ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)

9.2.1 Teste imunoenzimático direto

A pesquisa de PI foi realizada por meio de biópsias da extremidade do pavilhão auricular para a obtenção de fragmento com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e 0,5 cm de largura, utilizando-se o assinalador tipo “V”¹⁰. As colheitas entre animais foram realizadas após a desinfecção do aparelho com álcool 70%. O material obtido foi acondicionado em microtubos e congelado e encaminhado para o Laboratório Axys em Porto Alegre para a realização do teste imunoenzimático direto¹¹, seguindo as instruções do fabricante.

A triagem dos animais P's foi realizada em quatro etapas. Na etapa 1, 2247 animais foram avaliados, contemplando-se a última geração de fêmeas, vacas em lactação que pariram apenas macho ou aquelas sem descendentes vivos.

Dos animais testados na etapa 1, detectou-se 34 fêmeas infectadas, dos quais 19 eram bezerras com idade entre 0 a 12 meses, sete animais eram novilhas com idade entre 13 e 24 meses e 8 eram animais entre 25 e 36 meses. Destas, trinta fêmeas, foram re-testadas após 30 dias da primeira colheita para diferenciar a infecção entre transitória e persistente. Os quatro animais não testados morreram por doença respiratória ou foram precocemente descartados.

Nesta segunda etapa foi possível identificar que 19/30 animais repetiram o resultado positivo, sendo classificados como PI's. Os demais (n=11) foram classificados como transitoriamente infectados.

Na terceira etapa, todas as mães vivas dos PI's (n=11) e as mães das bezerras que morreram antes do re-teste (n=4) foram testadas, sendo possível detectar quatro mães PI (4/15) com idade compreendida entre 25 e 36 meses de idade.

A partir deste momento, iniciou-se a etapa 4 com a monitoração da infecção fetal, testando-se todas as bezerras nascidas na fazenda a partir da última PI detectada. Foram detectadas três bezerras PI's (3/103) nos dois primeiros meses após a finalização da triagem do rebanho. Sendo assim, a recontagem dos nove

¹⁰ Walmur®, Porto Alegre, Brasil

¹¹ Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus, Idexx, Maine, EUA

meses após a identificação da última PI foi reiniciada. Após este momento acompanhou-se o nascimento, comprovando-se a negatividade do rebanho

9.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Dos de 26 animais PI's identificados da etapa 1 a 4, 25 fêmeas foram selecionadas para a composição do grupo PI. O grupo controle (n=25) não infectado (NI) eram negativos no teste imunoenzimático direto. Estes animais foram selecionados aleatoriamente de acordo com as faixas etárias pareadas com as fêmeas PI's.

9.3.1 Avaliação dos animais PI's e Controle

9.3.1.1 Colheita de amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas dos animais foram colhidas por meio de punção da veia jugular externa, utilizando-se sistema a vácuo, após a antissepsia com álcool 70%. Foram obtidas alíquotas de sangue em tubo sem anticoagulante e em tubos com heparina sódica. As amostras foram transportadas ao laboratório em caixas de material isotérmico. No laboratório, as amostras sem anticoagulante foram centrifugadas para separação do soro, alíquotadas em microtubos e armazenados em freezer a - 40°C para posterior determinação da proteína sérica total e soroneutralização. As amostras dos tubos heparinizados foram utilizadas para a avaliação da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's).

9.3.1.2 Exames laboratoriais

9.3.1.2.1 Proteína total

A proteína sérica total foi determinada com o uso de refratômetro óptico de proteína¹² com escala entre 0 a 12 g/dL.

9.3.1.2.2 Hemograma

Para contagem de células utilizou-se o analisador hematológico automático¹³, calibrado para a espécie bovina, de acordo com as recomendações do fabricante. Os parâmetros analisados foram: contagem de leucócitos (Le), contagem de hemácias (He), Hemoglobina (Hb), hematócrito (Hto), volume corpuscular médio (VCM), concentração corpuscular média de hemoglobina (HCM), média da concentração corpuscular de hemoglobina (CHCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (*Red cell Distribution Width* -RDW), contagem de plaquetas (PLT) e plaquetócrito (PQT).

9.3.1.2.3 Fagocitose e produção de ERO's

Os ensaios para a avaliação da fagocitose e produção de ERO's pelos leucócitos sanguíneos foram realizados pela técnica de citometria de fluxo. As células sanguíneas foram incubadas com *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* coradas com iodeto de propídio¹⁴, segundo procedimentos descritos por Silva (2014). Cem microlitros de sangue heparinizado (2×10^5 células) foram pipetados em seis tubos de citometria de fluxo. O substrato diacetato de diclorofluoresceína 2,7 0,3 mM¹⁵ (200 µL) foi adicionado aos tubos 2, 5 e 6. As bactérias marcadas *Staphylococcus aureus* (50 µL) ou *Escherichia coli* (50 µL) foram adicionadas aos tubos de fagocitose, conforme quadro 3.

¹²RTP-12, Instrutherm

¹³ BC-2800 Vet[®], Mindray Bio-Medical Electronics Co.

¹⁴ PI, P4170, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

¹⁵ DCFH-DA e indicador EROS, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, nº GD6883

Quadro 3-Distribuição dos reagentes usados para a avaliação da Fagocitose e produção de H₂O₂

Tubos	Ensaio	PBS + SFB 10%	Sangue	DCFH	Bactérias
1	Branco	1000 µL	100 µL	-	-
2	ERO's basal	800 µL	100 µL	200 µL	-
3	Fagocitose <i>Sapi</i>	950 µL	100 µL	-	50 µL <i>Sapi</i>
4	Fagocitose <i>E.coli</i>	950 µL	100 µL	-	50 µL <i>E.coli</i>
5	ERO's estimulado <i>Sapi</i>	750 µL	100 µL	200 µL	50 µL <i>Sapi</i>
6	ERO's estimulado <i>E.coli</i>	750 µL	100 µL	200 µL	50 µL <i>E.coli</i>

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: SFB: Soro Fetal Bovino; DCFH: diacetato de diclorofluoresceína; *Sapi*: *Staphylococcus aureus* marcada com iodeto de propídeo; *E.coli*: *Escherichia coli* marcada com iodeto de propídeo.

A mistura foi incubada a 37° C durante 30 minutos, mantida em suspensão com o uso de agitador de tubos. A reação foi interrompida após a adição de 2 ml de EDTA 3 mM gelado. Os tubos foram centrifugados à 5 minutos a 4° C e 783xg. As hemácias foram lisadas adicionando-se 1 mL de água destilada ao *pellet*. Os tubos foram vortexados por 15 segundos, em seguida adicionou-se 1 mL de concentrado de PBS 2x em cada tubo. As amostras foram diluídas com 3 mL de PBS. Os tubos foram centrifugados à 783xg por 5 minutos (4° C). O sobrenadante foi desprezado. O *pellet* celular foi diluído em 1 ml de PBS. Os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente. Finalmente, o pellet celular foi ressuspenso em 300 µL de PBS para avaliação no citômetro. A avaliação foi realizada utilizando o citômetro de fluxo FACS Calibur¹⁶. Foram adquiridos 20 mil eventos utilizando-se o programa CellQuest® Software¹². Posteriormente, os eventos adquiridos foram analisados no programa Flow Jo¹⁷. O *gate* de granulócitos foi estabelecido de acordo com o tamanho (FSC) e granulosidade (SCC) das células. A produção de ERO'S e a fagocitose foram determinadas nos canais L1 e FL2, respectivamente. Os procedimentos utilizados para as análises no programa FlowJo estão ilustrados nas figuras 11 e 12.

¹⁶ Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA

¹⁷ Versão 7.6.1 para Windows, Tree Star Inc., Ashland, OR

Figura 11- Passo a passo empregado para a análise da fagocitose no programa FlowJo.

Legenda: (A) Distribuição dos leucócitos sanguíneos de acordo com o tamanho (SSC) e granulidade (FSC) (tubo 1)

Legenda: (B) Seleção dos granulócitos de acordo com seu tamanho e granulidade (tubo 1)

Legenda: (C) Histograma demonstrando a % de granulócitos que fagocitaram *Staphylococcus aureus* (FL2+)

Legenda : (D) Histograma demonstrando a % granulócitos que fagocitaram a *Escherichia coli* (FL2+);

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Figura 12- Passo a passo para a avaliação da produção de ERO's no programa Flow Jo.

Legenda: (A) Proporção de células que produziram ERO's sem estimulação

Legenda: (B) Proporção de células que produziram ERO's após estimulação com *S. aureus*

Legenda: (C) Proporção de células que produziram ERO's após a estimulação com a *E. coli*

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

9.3.1.2.4 Soroneutralização para viroses respiratórias

As amostras de soro dos animais PI's e NI's foram processadas no Laboratório de Virose de Bovinos no Instituto Biológico. A soroneutralização (SN) para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 foi realizada estritamente de acordo com o manual da OIE (2016). Para tanto, foram usadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando-se uma diluição constante do soro em $\log_2$ a partir das diluições 1:10 (BVDV-NADL), 1:2 (BoHV-1), 1:2 (BRSV) e 1:2 (BPI3-V), tendo como diluente o meio de cultivo celular *Minimum Essential Mediu*) contendo 1% de antibióticos e 5% de soro fetal bovino livre de anticorpos para BVDV. Para as viroses com diluição inicial 1:2, foram adicionados 50 μ L de soro em duplicatas nas cavidades das placas, no qual adicionaram-se 50 μ L da solução do respectivo vírus contendo TCID₅₀/100 μ L (50% *tissue culture infective doses*). Para o BVDV, o soro foi previamente diluído (1:5) antes de adicioná-lo aos poços. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora para BVDV, BRSV, BPIV-3 e por 18-24h para BoHV-1, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, suspensão de células *Madin-Darby Bovine Kidney* foi adicionada em cada cavidade das placas. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, durante quatro-cinco dias. A infectividade foi indicada pelo “efeito citopático” visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido. O título de ACs foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade e, consequentemente, o ECP em ambas as cavidades de cada diluição.

9.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados qualitativos foram analisados quanto a frequência e porcentagem dos achados. Na avaliação da associação dos grupos experimentais com os escores de diarreia e DRB foi utilizado o teste Qui-quadrado. O teste exato de Fisher foi utilizado em casos de baixo número de observações e quando as variáveis eram binárias.

Os dados quantitativos foram avaliados quanto à distribuição de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas foram submetidas a transformações numéricas, utilizando: raiz quadrática, Log₁₀ e inversa.

A comparação entre grupos (PI x NI) foi realizada através do teste T-Student para as amostras independentes. As comparações entre grupos das variáveis que não passaram pelas transformações foram feitas através do teste de Mann-Whitney.

As variáveis quantitativas com distribuição normal ou normalizadas foram avaliadas em relação ao efeito da faixa etária pela análise de variância (ANOVA), individualmente em cada grupo experimental (PI x NI), com posterior teste *Post-hoc* de Bonferroni. Já as variáveis não paramétricas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis para verificar o efeito da faixa etária dentro de cada grupo experimental.

10 RESULTADOS

10.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os dados obtidos para os componentes do eritrograma estão apresentadas na tabela 7 e Figuras 13, 14 e 15.

Os valores obtidos os outros parâmetros hematológicos (He, VCM, CHCM e RDW) foram semelhantes entre os grupos experimentais.

Os animais entre 13-24 meses apresentaram diferenças para os parâmetros Hb ($P=0,012$), HCT($P=0,030$), VCM($P=0,035$), HCM ($P=0,019$), sendo que as fêmeas PI apresentaram os menores valores em relação NI's. Por fim, as fêmeas com idade entre 25-36 meses apresentaram diferenças ou tendências entre grupos para os seguintes parâmetros: PLT ($P=0,028$), He ($P=0,070$), HCM ($P=0,092$) e PQT ($P=0,055$).

A comparação etária dentro de cada grupo pela análise de variância (ANOVA) mostrou variações significativas para os parâmetros He, VCM, HCM e RDW para ambos os grupos experimentais. A Hb apresentou diferenças entre as idades no grupo NI. As comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni dos parâmetros em relação às categorias etárias em cada grupo experimental demonstrou que o número de He apresentou comportamento diferente quando os grupos foram analisados individualmente. No grupo PI, os animais com <12 meses de idade apresentaram os maiores valores de He ($PI=7,79\pm1,78$; $NI=8,34\pm2,48\times10^6/\mu L$), enquanto os menores valores foram observados nos animais entre 13-24 meses de idade PI ($5,79\pm1,16\times10^6/\mu L$). No grupo NI observou-se diminuição gradual no número de hemácias com o avanço da faixa etária.

Nas comparações múltiplas (*Post-hoc* Bonferroni) a Hb demonstrou variações apenas no grupo NI. Os animais com idade 25-36 meses apresentaram os menores valores de Hb ($NI=9,66\pm0,76$), enquanto os maiores valores foram nas fêmeas com idade entre 13-24 meses ($11,33\pm1,01$) e com idade inferior a 12 meses ($10,25\pm1,63$), ($P=0,032$). Em geral, o grupo PI apresentou tendência para menores valores de Hb ($P=0,098$), além disso observou-se diferença entre os grupos na faixa etária entre 13 e 24 meses ($P=0,012$).

Em geral o valor do VCM foi maior no grupo NI, observando-se diferenças entre grupos apenas na faixa etária entre 13 e 24 meses ($P=0,035$). Os animais de

com idade inferior a 12 meses apresentaram os menores valores de VCM em ambos grupos (PI=37,78±6,94; NI=39,92±6,16), observando-se aumento desse índice hematimétrico nos momentos posteriores ($P \leq 0,002$).

Nas comparações múltiplas (Post Hoc Bonferroni) revelou aumento da variável HCM de acordo com a idade em ambos os grupos NI ($P=0,000$) e PI ($P=0,001$). Em geral, a variável HCM apresentou tendência estatística para menores valores no grupo PI ($P=0,092$), observando-se o mesmo fenômeno para fêmeas entre 25 e 36 meses. Diferenças entre grupos para HCM foi detectado na faixa etária entre 13 e 24 meses ($P=0,019$).

As comparações múltiplas da variável RDW (%) observou-se diminuição de valores de acordo com a faixa etária no grupo NI ($P=0,041$) e PI ($P=0,013$). Não foi possível encontrar diferenças entre grupos para a variável RDW ($P \geq 0,108$).

Na análise geral, o número de plaquetas (PLT) foi inferior para o grupo PI ($1,90 \pm 1,21 \times 10^5$) em relação ao grupo NI ($2,75 \pm 1,45 \times 10^5$), observando-se diferença entre grupos experimentais ($P=0,040$). Os outros componentes do eritrograma Hb ($P=0,098$), Hto ($P=0,084$), HCM ($P=0,092$) e PQT ($P=0,059$) também apresentaram menores valores para o grupo PI.

As comparações entre grupos experimentais por faixa etária pelo teste T não detectou diferenças para os componentes do heritrograma nos animais com idade inferior a 12 meses, exceto para o plaquetócrito (PQT).

Após a avaliação individual do eritrograma, detectou-se a frequência de anemia em 8% (2/25) dos animais do grupo PI classificadas como normocítica normocrômica. O grupo NI não apresentou anemia.

Tabela 7- Valores médios e desvios-padrão dos componentes do eritrograma em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI=25) e bovinos não infectadas (NI=25).

Parâmetros	Grupo	Geral	Faixas etária			P-valor
			<12 meses	13-24 meses	25-36 meses	
He ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	PI	6,77 $\pm$ 1,42	7,79 $\pm$ 1,78 ^a	5,79 $\pm$ 1,16 ^b	6,57 $\pm$ 0,71 ^{ab}	0,031*
	NI	6,89 $\pm$ 1,84	8,34 $\pm$ 2,48 ^a	6,46 $\pm$ 0,93 ^{ab}	6,02 $\pm$ 0,62 ^b	0,010*
	P-valor	0,861	0,652	0,300	0,070†	
Hb (g/dL)	PI	9,56 $\pm$ 1,59	9,35 $\pm$ 1,86	8,80 $\pm$ 1,77	10,13 $\pm$ 1,15	0,240
	NI	10,19 $\pm$ 1,28	10,25 $\pm$ 1,63 ^{ab}	11,33 $\pm$ 1,01 ^a	9,66 $\pm$ 0,76 ^b	0,032*
	P-valor	0,098†	0,321	0,012*	0,278	
Hto (%)	PI	29,22 $\pm$ 5,48	28,71 $\pm$ 5,81	27,25 $\pm$ 5,64	30,7 $\pm$ 5,25	0,462
	NI	31,52 $\pm$ 4,21	32,07 $\pm$ 1,54	34,28 $\pm$ 3,70	29,93 $\pm$ 2,43	0,112
	P-valor	0,084 †	0,256	0,030*	0,670	
VCM (fL)	PI	44,44 $\pm$ 6,98	37,78 $\pm$ 6,94 ^b	47,38 $\pm$ 5,51 ^a	47,7 $\pm$ 3,98 ^a	0,002*
	NI	47,35 $\pm$ 7,14	39,92 $\pm$ 6,16 ^b	53,45 $\pm$ 2,60 ^a	49,98 $\pm$ 4,09 ^a	0,000*
	P-valor	0,120	0,526	0,035*	0,197	
HCM (pg)	PI	14,26 $\pm$ 2,08	12,22 $\pm$ 2,04 ^b	15,21 $\pm$ 1,70 ^a	15,23 $\pm$ 1,05 ^a	0,001*
	NI	15,25 $\pm$ 2,38	12,68 $\pm$ 1,83 ^b	17,63 $\pm$ 1,27 ^a	16,05 $\pm$ 1,14 ^a	0,000*
	P-valor	0,092 †	0,641	0,019*	0,092 †	
CHCM (mg/dL)	PI	32,27 $\pm$ 0,69	32,56 $\pm$ 0,82	32,3 $\pm$ 0,44	32,05 $\pm$ 0,66	0,292
	NI	32,30 $\pm$ 1,19	31,99 $\pm$ 1,42	33,08 $\pm$ 1,09	32,26 $\pm$ 1,02	0,232
	P-valor	0,721	0,330	0,144	0,575	
RDW (%)	PI	18,30 $\pm$ 2,48	20,4 $\pm$ 3,19 ^a	17,78 $\pm$ 1,42 ^{ab}	17,06 $\pm$ 1,13 ^b	0,013*
	NI	17,22 $\pm$ 1,74	18,45 $\pm$ 2,32 ^a	16,88 $\pm$ 1,33 ^{ab}	16,43 $\pm$ 0,68 ^b	0,041*
	P-valor	0,108	0,247	0,257	0,304	
PLT ($\times 10^5 \mu\text{L}$)	PI	1,90 $\pm$ 1,21	2,13 $\pm$ 1,42	2,03 $\pm$ 1,24	1,67 $\pm$ 1,11	0,704
	NI	2,75 $\pm$ 1,45	3,27 $\pm$ 1,55	1,75 $\pm$ 1,58	2,8 $\pm$ 1,13	0,143
	P-valor	0,040*	0,147	0,738	0,028*	
PQT (%)	PI	0,10 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,07	0,773
	NI	0,15 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,08	0,10 $\pm$ 0,09	0,16 $\pm$ 0,07	0,165
	P-valor	0,059 †	0,100 †	0,592	0,055†	

* Indica diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre faixas etárias pela one-way ANOVA e *Post-hoc* Bonferroni. He= Hemácias; H= Hemoglobinas; Hto= Hematócrito; VCM= Volume Corpuscular Médio; HCM= Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM= Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW= *Red cell Distribution Width*; PLT= Plaqueta; PQT= Plaquetócrito;

Figura 13 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Hto), em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) pelo teste T de *Student*.

Figura 14- Valores médios e desvios-padrão dos índices hematimétricos Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: Volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW).

* Indica diferença entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) pelo teste T de *Student*.

Figura 15-Valores médios e desvios-padrão das plaqueta (PLT) e plaquetócrito (PQT), em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) pelo teste T de *Student*.

Em relação aos valores absolutos do leucograma ($\times 10^3/\mu\text{L}$), as fêmeas PI's com idade inferior a 12 meses apresentaram menor número de leucócitos totais que aquelas não infectadas ($P=0,034$) apresentados na tabela 8 e figura 16.

Este fato está associado as tendências para menor número de linfócitos ($P=0,095$) e neutrófilos ($P=0,082$) nesta faixa etária. Os animais com idade entre 13 e 24 meses apresentaram menor número de linfócitos ($P=0,086$), maiores números de granulócitos ($P=0,109$) e monócitos ($P=0,073$). Em contrapartida, os animais PI's entre 25-36 meses apresentaram menor valor para granulócitos ($P=0,036$).

Os valores relativos dos granulócitos foram semelhantes entre os grupos na análise geral ($P=0,553$) porém, as novilhas entre 13-24 meses de idade do grupo PI apresentaram maiores valores em relação ao grupo NI ($P=0,013$).

Em geral, os valores relativos de monócitos (%) foram significativamente menores para o grupo NI ($P=0,014$), devido aos animais de <12 meses ($P=0,037$) e de 13 a 24 meses ($P=0,008$).

Pôde-se observar que grupo NI apresentou maiores valores de linfócitos em relação ao grupo PI, observando-se tendência estatística para os valores absolutos ($P=0,092$) e relativos (%) ($P=0,075$).

Esse valor deve-se ao menor número de linfócitos nas faixas etárias de 13-24 meses ($P=0,000$) e nas fêmeas <12 meses ($P=0,277$).

Tabela 8- Médias e desvios-padrão para os componentes do leucograma em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI, n=25) ou não infectadas (NI, n=25) com o BVDV-2.

Leucograma	Grupos	Geral	Faixas etárias (meses)			P-valor
			<12	13-24	25-36	
Leucócitos Totais	PI	12,4±7,2	8,59±2,9	15,28±8,24	13,51±8,08	0,122
	NI	14,0±6,0	12,79±3,93	12,90±4,14	15,54±7,94	0,684
	P-valor	0,144	0,034*	0,739	0,412	
Granulócitos (%)	PI	48,42±14,24	56,66±9,35 ^a	51,82±13,62 ^a	40,58±13,41 ^b	0,028*
	NI	44,24±14,24	51,61±15,79 ^a	32,65±7,66 ^b	45,19±12,56 ^{ab}	0,038*
	P-valor	0,553	0,407	0,013*	0,364	
Granulócitos (x10 ³ cél/μL)	PI	5,6±3,2	4,76±1,49	8,17±5,54	4,85±1,68	0,184
	NI	5,8±1,7	6,24±1,71 ^a	4,15±1,39 ^b	6,28±1,44 ^a	0,009*
	P-valor	0,425	0,082 †	0,109	0,036*	
Monócitos (%)	PI	13,48±3,10	15,03±2,58 ^a	15,22±3,10 ^a	11,42±2,28 ^b	0,007*
	NI	11,50±2,29	12,35±2,02	9,82±2,54	11,82±2,03	0,099†
	P-valor	0,014*	0,037*	0,008*	0,669	
Monócitos (x10 ³ cél/μL)	PI	1,6±1,0	1,26±0,51	2,32±1,47	1,52±0,98	0,117
	NI	1,6±0,8	1,58±0,48	1,27±0,62	1,83±1,12	0,311
	P-valor	0,801	0,214	0,073††	0,336	
Linfócitos (%)	PI	36,09±16,54	28,31±10,89 ^b	24,63±12,81 ^b	48,00±14,44 ^a	0,002*
	NI	44,26±15,18	36,04±15,94 ^b	57,53±8,30 ^a	42,99±13,39 ^b	0,022*
	P-valor	0,075†	0,277	0,000*	0,409	
Linfócitos (x10 ³ cél/μL)	PI	5,1±4,7	2,56±1,54 ^b	4,80±2,76 ^{ab}	7,14±6,06 ^a	0,029*
	NI	6,7±4,5	4,98±3,26	7,48±2,80	7,43±5,85	0,275
	P-valor	0,092†	0,095 †	0,086 †	0,856	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$). P-valor em coluna: análise de variância entre <12; 13-24 e 25-36 meses por cada grupo experimental (ANOVA); Letras minúsculas na mesma linha = Resultados do teste *Post-hoc* Bonferroni; P- valor em linha: comparações entre grupos pelo teste T e *Student*. geral e por faixa etária.

Figura 16- Médias e desvios-padrão para os componentes do leucograma em fêmeas bovinas Holandesas persistentemente infectadas (PI, n=25) ou não infectadas (NI, n=25) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) pelo teste T de *Student*.

10.2 AVALIAÇÃO DA FAGOCITOSE

Em geral, a taxa da fagocitose (%) do *S. aureus* apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais ($P=0,000$), conforme a tabela 9 e Figura 17. Observou-se que o grupo PI apresentou maiores valores em relação ao grupo NI nas faixas etárias <12 meses ($P=0,000$) e 13 e 24 meses de idade ($P=0,000$). A fagocitose *S. aureus* (%) variou conforme a faixa etária, nos grupos PI ($P=0,038$) e NI ($P=0,000$).

A intensidade da fagocitose de *S. aureus* (MFI= *Mean Fluorescence Intensity*) também foi diferente entre os grupos experimentais ($P=0,000$). Observou-se maiores valores no grupo PI em relação ao grupo NI nas faixas etárias <12 meses ($P=0,000$), entre 13 e 24 meses ($P=0,000$) e entre 25 e 36 meses de idade ($P=0,000$). A intensidade da fagocitose variou entre as faixas etárias apenas no grupo NI ($P=0,000$).

No geral, a taxa de fagocitose (%) da *E. coli* apresentou tendência estatística entre os grupos experimentais ($P=0,079$). Observou-se tendência entre os grupos na faixa etária <12 meses ($P=0,060$), observando-se maiores valores no grupo PI.

A intensidade da fagocitose da *E. coli* (MFI) foi maior no grupo PI em relação ao grupo NI ($P=0,000$). O MFI nos animais <12 meses ($P=0,000$) e entre 25 e 36 meses de idade observou-se diferença nas comparações entre os grupos ($P=0,009$).

Em geral, a taxa de granulócitos produzindo ERO's basal foi maior no grupo NI ($P=0,005$), especialmente na faixa de idade <12 meses de idade ($P=0,000$) apresentados na Tabela 9 e Figura 18.

Por outro lado, o grupo PI apresentou maior intensidade (MFI) na produção de ERO's basal ($P=0,011$) em relação ao grupo NI. Os valores foram semelhantes entre os grupos nas fêmeas <12 ($P=0,874$), diferente estatisticamente nos animais 13-24 meses ($P=0,000$) e os animais 25-36 meses observou-se tendência ($P=0,074$). O grupo NI apresentou variações entre as faixas etárias ($P=0,000$), enquanto o grupo PI não apresentou variações ($P=0,296$).

A taxa de granulócitos produzindo ERO's quando estimulada com *S. aureus* foi diferente entre os grupos experimentais ($P=0,000$), observando-se maiores valores no grupo NI. A mesma diferença entre os grupos foi observada para os animais com idade <12 meses ($P=0,000$) e entre 25-36 meses ($P=0,002$).

A intensidade (MFI) da produção de ERO's pelos granulócitos estimulados com *S. aureus* foi maior no grupo PI ($P=0,011$), observando-se diferenças entre os grupos na faixa etária de 13-24 meses de idade ($P=0,000$). Nas faixas etárias <12 e 25 à 36 meses, a intensidade da produção de ERO's foi semelhante ($P=0,747$; $P=0,170$, respectivamente). O grupo NI apresentou diferenças entre as faixas etárias ($P=0,048$), enquanto os valores entre as idades foram semelhantes no grupo PI ($P=0,912$).

A taxa de ERO'S da *E. coli* foi diferente entre os grupos PI e NI ($P=0,000$). Esta diferença também foi observada nas faixas etárias <12 ($P=0,000$) e entre 25 e 36 meses de idade ($P=0,000$).

A intensidade (MFI) da produção de ERO's pelos granulócitos estimulados com *E. coli* foi maior grupo PI (0,013). Na comparação entre os grupos, a faixa etária de 25-36 meses apresentou tendência estatística ($P=0,050$).

Tabela 9- Média e desvios-padrão da fagocitose e produção de Espécies Reativas a Oxigênio (ERO's) basal e estimulados com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.

	Grupo	Geral	Faixas etária (meses)			P-valor
			<12	13-24	25-36	
Fagocitose <i>S. aureus</i> (%)	PI	86,99±14,70	95,97±6,43	74,52±7,30	87,25±17,47	0,038*
	NI	64,72±26,15	56,47±21,35	37,53±15,24	87,64±11,27	0,000*
	P-Valor	0,000*	0,000*	0,000*	0,220	
Fagocitose <i>S. aureus</i> (MFI)	PI	1526,60±1170,00	1302,50±248,97	1228,83±276,37	1852,00±1731,72	0,827
	NI	121,56±151,71	108,45±114,16	28,40±8,47	181,92±191,66	0,000*
	P-Valor	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	
Fagocitose <i>E. coli</i> (%)	PI	76,60±20,20	88,60±18,47	61,90±4,98	80,44±21,84	0,164
	NI	67,68±21,21	64,12±26,38		71,25±15,47	0,645
	P-Valor	0,079 †	0,060 †		0,161	
Fagocitose <i>E. coli</i> (MFI)	PI	1197,28±999,57	1151,00±745,60	772,5±92,88	1462,63±1347,97	0,505
	NI	231,01±273,01	124,67±111,48		337,36±348,49	0,109
	P-Valor	0,000*	0,000*		0,009*	
ERO'S basal (%)	PI	92,91±10,83	92,60±15,01	93,12±7,13	93,03±9,93	0,912
	NI	94,86±11,47	99,61±0,27	84,50±20,75	97,06±3,53	0,001*
	P-Valor	0,005*	0,000*	0,681	0,163	
ERO'S basal (MFI)	PI	946,96±561,64	1147,12±786,53	1105,67±278,02	714,82±423,00	0,296
	NI	526,05±581,81	956,50±700,04	95,57±57,66	447,81±448,94	0,000*
	P-Valor	0,011*	0,874	0,000*	0,074†	
ERO's <i>S. aureus</i> (%)	PI	86,49±11,61	82,37±15,31	91,73±4,74	86,25±11,39	0,261
	NI	96,23±5,75	98,71±0,84	92,15±9,80	96,65±3,94	0,111
	P-Valor	0,000*	0,000*	0,311	0,002*	
ERO's <i>S. aureus</i> (MFI)	PI	1559,08±645,71	1524,87±1016,95	1662,00±374,88	1524,72±509,61	0,912
	NI	956,45±909,45	1354,39±983,54	200,53±93,43	1079,36±904,09	0,048*
	P-Valor	0,011*	0,747	0,000*	0,170	
ERO's <i>E. coli</i> (%)	PI	85,30±17,85	78,9±29,50	93,50±4,99	84,90±11,35	0,102
	NI	97,85±2,19	98,59±1,11		97,21±2,75	0,327
	P-Valor	0,000*	0,000*		0,000*	
ERO's <i>E. coli</i> (MFI)	PI	1582,66±762,48	1852,85±943,61	1911,50±507,19	1231,36±650,10	0,147
	NI	941,93±769,84	1179,20±771,80		734,25±754,40	0,166
	P-Valor	0,013*	0,346		0,050†	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

* Indica diferença ($p \leq 0,05$) e † Indica tendência ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) entre os grupos experimentais. P-valor nas linhas indica comparações entre os grupo pelo teste T; P-valor nas colunas indica diferença entre grupos pelo one-way ANOVA.

Figura 17- Média e desvios-padrão da fagocitose estimulados com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença ($p \leq 0,05$) e † Indica tendência ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) entre os grupos experimentais.

Figura 18- Média e desvios-padrão da produção de Espécies Reativas a Oxigênio (ERO's) basal e estimuladas com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$).

10.3 SORONEUTRALIZAÇÃO PARA VIROSES RESPIRATÓRIAS

Na análise geral, o grupo PI apresentou valor mediano menor em relação ao grupo NI para os títulos de anticorpos para BVDV, BRSV e BoHV-1 ($P=0,000$). O BPIV-3 não apresentou diferença entre os grupos experimentais ($P=0,146$).

A titulação de anticorpos específicos entre grupos experimentais, apresentou perfil semelhante em todas as faixas etárias (Tabela 10 e Figura 19). Os títulos de anticorpos específicos foram menores no grupo PI frente aos vírus BVDV, BRSV e BoHV-1 em todas as faixas etárias. O teste Mann Whitney mostrou diferenças entre grupos nas faixas etárias <12 ($P=0,013$; 0,002 e 0,031, respectivamente), 13-24 ($P=0,026$; 0,003 e 0,012, respectivamente) e 25-36 meses de idade ($P=0,000$; 0,001 e 0,006, respectivamente).

A comparação dos títulos de anticorpos em cada grupo experimental pelo teste Kruskal-Wallis revelou valores constantes para o BVDV no grupo PI ($P=0,250$) e no grupo NI ($P=0,411$). A mediana dos títulos de anticorpos foram zero em todas as faixas etárias para o BVDV. Em relação ao BRSV, observou-se tendência para aumento dos valores de acordo com a faixa etária no grupo NI ($P=0,092$), enquanto o grupo PI manteve valores constantes e praticamente zero ($P=0,624$). Em relação ao BPIV-3, observou-se aumento dos valores de acordo com a faixa etária no grupo PI ($P=0,042$) e NI ($P=0,008$). Em relação ao BoHV-1 observou-se valores constantes de acordo com a idade no grupo NI ($P=0,885$), em contrapartida os valores aumentaram para o grupo PI.

Tabela 10- Mediana (Valores mínimo e máximo) para os títulos de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias em fêmeas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV.

Víruses	Grupos	Geral	Faixas etárias (meses)			P-valor
			<12	13-24	25-36	
BVDV (Log ₂)	PI	0 (0 -7,3)	0 (0-7,3)	0 (0-4,3)	0 (0-0)	0,250
	NI	7,3 (0 -11,3)	6,8 (0-11,3)	5,3 (0-10,3)	8,3 (3,3-10,3)	0,411
	P-valor	0,000*	0,013*	0,026*	0,000*	
BRSV (Log ₂)	PI	0 (0 – 6,0)	0,5 (0-3,0)	0 (0-3,0)	0 (0-6,0)	0,624
	NI	5,0 (2,0 -9,0)	4,5 (2,0-7,0) ^b	5,0 (4,0-9,0) ^{ab}	6,0 (4,0-8,0) ^a	0,092†
	P-valor	0,000*	0,002*	0,003*	0,001*	
BPIV-3 (Log ₂)	PI	6,0 (0 – 9,0)	3,5 (0-8,0) ^b	5,5 (3,0-8,0) ^{ab}	7 (4,0-9,0) ^a	0,042*
	NI	8,0 (0 -9,0)	4,0 (0-8,0) ^b	8,5 (2,0-9,0) ^a	9 (4,0-9,0) ^a	0,008*
	P-valor	0,146	0,874	0,145	0,108	
BoHV-1 (Log ₂)	PI	5,0 (0 – 9,0)	3,5 (1,0-9,0) ^{ab}	2,0 (0-7,0) ^b	6,0 (3,0-9,0) ^a	0,024*
	NI	8,0 (3,0 – 10,0)	8,5 (3,0-9,0)	8,5 (5,0-9,0)	8,0 (7,0-10,0)	0,885
	P-valor	0,000*	0,031*	0,012*	0,006 †	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: * Indica diferença ($p \leq 0,05$) e † Indica tendência ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) entre os grupos experimentais. P-valor nas linhas indica comparações entre os grupo pelo teste Mann-Whitney; P-valor nas colunas indica diferença entre grupos pelo teste Kruskal-Wallis.

Figura 19- Valores individuais e mediana para os títulos de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias em fêmeas persistentemente infectados (PI) e não infectados (NI) com o BVDV.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda: BVDV: Vírus da Diarreia Viral Bovina; BRSV: Vírus Sincicial Respiratório Bovino; BPIV-3: Parainfluenza tipo 3 e BoHV-1: Herpesvírus Bovino tipo 1.

10.4 PROTEÍNA SÉRICA TOTAL

Na análise geral a concentração de PT (g/dL) foi menor no grupo PI ($6,53 \pm 0,93$) em relação ao grupo NI ($6,99 \pm 0,66$), observando-se diferenças entre os grupos ($P=0,021$), apresentados na Tabela 11 e Figura 20.

Avaliando-se o comportamento da proteína dentro de cada categoria observa-se que o grupo NI apresentam maiores valores nos animais de com idade <12 ($P=0,022$) e entre 13-24 meses ($P=0,008$) em relação ao grupo PI. Os teores de proteína sérica total variaram de acordo com a faixa etária no grupo PI ($P=0,000$) e NI ($P=0,001$)

Tabela 11-Valores médios e desvios-padrão da proteína sérica total em fêmeas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.

Parâmetros	Grupo (N)	Geral	Faixas etárias			P-valor
			<12 meses	13-24 meses	25-36 meses	
PT (g/dL)	PI(25)	6,53±0,93	5,56±0,44 ^b	6,57±0,10 ^b	7,21±0,42 ^a	0,000*
	NI(24)	6,99±0,66	6,29±0,59 ^b	7,20±0,14 ^a	7,41±0,39 ^a	0,001*
	P-valor	0,021*	0,022*	0,008*	0,278	

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda:* Indica diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$) pelo teste T de *student*; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA e *Post-hoc* Bonferroni.

Figura 20-Valores médios e desvios-padrão da proteína sérica total em fêmeas persistentemente infectadas (PI) e não infectadas (NI) com o BVDV-2.

Fonte: Sobreira, N.M (2018).

Legenda:* Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais pelo teste T de *Student*

11 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou o perfil hematológico, a atividade funcional dos granulócitos e a produção de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias em fêmeas persistentemente infectadas para o BVDV-2.

O perfil hematológico entre grupos experimentais foram comparados para as variáveis He, Hb, Hto, VCM, HCM, CHCM, RDW, PLT e PQT. A análise permitiu detectar diferenças para os parâmetros He, Hb, Hto, VCM, HCM, PQT e PQT.

A contagem de hemácias não variou na análise geral entre os grupos, porém os animais do grupo PI entre 25 a 36 meses de idade ($6,57 \times 10^6$) apresentaram maiores valores em relação ao grupo NI ($6,02 \times 10^6$).

A hemoglobina e o hematócrito variaram na análise geral e entre os grupos experimentais, sendo que as PI's apresentaram menores valores em relação ao NI. Essa diferença foi ainda mais evidente para os dois parâmetros nas fêmeas de 13 e 24 meses de idade, no qual as PI's apresentaram hemoglobina equivalente a 8,80 g/dL e hematócrito igual a 27,25% enquanto as fêmeas NI's apresentaram 11,33 g/dL e 34,28%, respectivamente.

Stokstad & Loken (2002) avaliaram o perfil hematológico de dezoito bezerros PI's em relação à quatro bezerros não PI. Estes autores também encontraram valores de hemácias e hemoglobina aumentados no grupo PI porém, essas diferenças encontradas entre os grupos não foram significativas.

Em relação aos índices hematimétricos, as fêmeas PI's com idade entre 13 e 24 meses apresentaram 47,38 fL de VCM e 15,21 pg de HCM, enquanto as NI's apresentaram 53,45 fL, e 17,63 pg, respectivamente. O HCM das PI's também foi menor na faixa etária de 25 a 36 meses. Provavelmente este fato pode ser justificado pelos menores valores de Hb nas PI's.

Os valores de PLT e PQT foram maiores no grupo NI em relação aos PI's no geral e na faixa etária entre 25 a 36 meses de idade. Em geral, o número de PLT foi de $1,90 \times 10^5$ μ L para as fêmeas PI's e $2,75 \times 10^5$ μ L para as fêmeas NI's, o PQT foi igual a 0,10 % para as PI's e 0,15% para a NI's.

Piccinini et al (2006) estudaram a contagem de plaquetas em animais PI BVDV-1 NCP, transitoriamente infectados e saudáveis. Os autores encontraram maiores contagens de plaquetas para os animais PI em relação aos outros grupos.

Existem indícios de que animais experimentalmente infectados com o BVDV-2 apresentam alterações morfológicas e diminuição na contagem de plaquetas. Essas alterações podem evoluir para as manifestações de Síndrome Hemorrágica (WALZ et al., 1999; WOOD et al., 2004). Liebler-Tenorio (2005) associou estes achados com a infecção da medula óssea pelo BVDV, o que afeta a população de megacariócitos, resultando na diminuição da produção e função das plaquetas. Este fato justificaria os resultados de menores contagens de plaqueta e plaquetócrito.

A leucopenia transitória em animais experimentalmente infectados já foi reportada por vários autores (WOOD et al., 2004; MULLER-DOBLIES et al., 2004; AVCI, YAVRU & BULUT, 2010). Fato intrigante é que Stokstad & Loken (2002) não relataram diferenças nos componentes do leucograma entre animais PI e NI.

Na interpretação do leucograma foi possível detectar diferenças dos valores absolutos de leucócitos totais nos animais <12 meses de idade, observando menores valores nos PI's. Piccinini et al. (2006) detectaram que os PI's apresentaram diminuição significativa no número de leucócitos totais, corroborando com os achados encontrados no presente estudo.

Em geral, as fêmeas PI's apresentaram menores números de linfócitos absolutos (PI=12,4; NI=14,0 $\times 10^3$ cél/ μ L) e relativos (PI= 36,09; NI=44,26%). Este fato está associado aos hemogramas dos animais <12 meses e entre 13 e 24 meses de idade. Estes achados contradizem com os de Piccinini et al. (2006) que encontraram valores superiores de linfócitos relativos nos PI's.

Os monócitos relativos foram maiores para os PI's (13,48%) em relação aos NI's (11,50%). Este fato foi constante para as fêmeas <12 meses e entre 13 e 24 meses de idade. Piccinini et al. (2006) detectaram menores proporções de monócitos nos animais PI's.

Em relação aos valores absolutos dos granulócitos observou-se diferenças entre os grupos experimentais nas fêmeas <12 meses (PI=4,46; NI= 6,24 $\times 10^3$ cél/ μ L) e entre 25 e 36 meses de idade (PI= 4,85; NI=6,28 $\times 10^3$ cél/ μ L). Este fato já havia sido relatado por Piccinini et al. (2006) e Brewoo (2007). Em contrapartida, as fêmeas PI entre 13 a 24 meses de idade apresentaram valores absolutos e relativos de granulócitos maiores (PI=8,17 $\times 10^3$ cél/ μ L), em relação ao grupo NI (4,15 $\times 10^3$ cél/ μ L).

Liebler-Tenorio, Ridpath, Neill (2004) comprovaram a distribuição do BVDV NCP nos tecidos linfóides e no gastrintestinal.

Segundo Chase (2015) o BVDV promove apoptose dos linfócitos e infecta uma variedade de tipos celulares como os monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos.

A leucopenia dos animais PI's pode estar associada linfopenia e diminuição dos granulócitos absolutos.

Na avaliação da resposta imune inata, as PI's apresentaram maior proporção e intensidade (%) de fagocitose após a estimulação com *S. aureus* e *E. Coli*. Thakur et al. (2014) relataram que os neutrófilos expostos ao BVDV *in vitro* aumentam a expressão do receptor CD14. O CD14 é parte do complexo receptor *Toll-like* 4, que reconhece os Padrões Moleculares Associados aos Patógenos, o que poderia contribuir para esta maior taxa e intensidade da fagocitose.

A proporção de células produzindo ERO's endógeno ou estimuladas com *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* foi menor nas PI's em relação às fêmeas NI's. Em contraste, a intensidade da produção de EROS's basal ou induzido pelas bactérias *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* foi maior nas PI's do que nas NI's.

Segundo TIZARD (2008) a destruição da bactéria fagocitada ocorre por meio do *burst* oxidativo e liberação de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio. Analisando a taxa de fagocitose e de ERO's observou-se que, as bactérias foram fagocitadas pelos granulócitos, porém apresentaram menor taxa de destruição pela menor produção de radicais livres.

Em relação a resposta imune específica para as viroses respiratórias foi possível observar que 88% dos animais PI's não produziram anticorpos neutralizantes para o BVDV. Este fato está associado com a imunotolerância ao vírus NCP responsável pela infecção fetal entre 40 e 120 dias de gestação. Dos três animais PI's que apresentaram títulos de anticorpos, dois possuíam idade entre 33 e 49 dias de vida, indicando o efeito da ingestão de colostro sobre a sorologia desses animais. Além disso, existe a possibilidade da montagem de resposta imune heteróloga à cepas do BVDV, sendo assim esse fato pode justificar a presença de títulos de anticorpos contra o vírus no terceiro animal.

A mediana dos títulos de anticorpos para BRSV nas fêmeas PI's foi zero, enquanto para o grupo não infectado foi Log₂ 5. Todas as fêmeas NI's (100%) apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes contra BRSV, enquanto apenas

32% (8/25) das PI's apresentaram fraca resposta imune humoral. Além disso dois animais apresentavam idade inferior a dois meses.

Os animais PI's apresentaram a mediana $\text{Log}_2 6,0$ para os títulos de anticorpos neutralizantes para BPIV-3, enquanto no grupo NI foi $8,0 \text{ Log}_2$. Duas das fêmeas NI's (8%; 2/25) não apresentaram anticorpos para o vírus da Parainfluenza. Apenas 1/25 das fêmeas PI's não apresentaram anticorpos contra BPIV-3.

A mediana dos títulos de anticorpos neutralizantes para a BoHV das PI's e NI's foram de $5,0$ e $8,0 \text{ Log}_2$, respectivamente. Todos os animais apresentaram títulos para esta virose respiratória exceto 1/25 do grupo PI (4%).

Silflow, Degel e Harmsen (2005) estudaram os mecanismos de defesa imunológica de quatro bezerros infectados experimentalmente com BVDV-1 CP intrabronquial no dia 0 e no dia 31. As respostas celulares e humorais foram avaliada por lavados broncoalveolar. Os autores observaram que as respostas imunes inata mediadas por células no pulmão bovino com BVDV são capazes de eliminar o vírus dentro de 2-3 semanas pós infecção. Além disso, as populações activadas de linfócitos T por imunidade inata e de memória, combinadas com a produção específica de anticorpos de BVDV, contribuem para a eliminação rápida de BVDV após segunda exposição viral.

As fêmeas PI's apresentaram leucopenia por linfopenia. Chase (2015) relatou que o BVDV promove apoptose dos linfócitos, resultando em depleção linfóide das células B, células T auxiliares (CD4^+), T citotóxicas (CD8^+) e células T gama-delta. Os linfócitos B são importantes mediadores da resposta imune específica, a sua depleção corrobora com a fraca resposta imune para as viroses respiratórias.

Em geral, o teor de proteína total das PI's ($6,53 \text{ g/dL}$) foi menor em relação a das NI's ($6,99 \text{ g/dL}$). Observou-se em todas as faixas etárias, porém as diferenças foram detectadas nas fêmeas <12 (PI= $5,56$; NI= $6,29 \text{ g/dL}$) e 13-24 meses de idade (PI= $6,57$; NI= $7,20 \text{ g/dL}$). Em relação ao menor teor de proteína total sérica, o baixo índice de anticorpos neutralizantes para as viroses respiratórias pode estar associado, visto que a proteína total é caracterizada também pelas imunoglobulinas.

12 CONCLUSÃO

Com base nos dados desta pesquisa pode-se concluir que:

- a) As fêmeas PI apresentaram menor contagem de plaquetas;
- b) A presença da infecção BVDV nas fêmeas PI causou leucopenia por linfopenia e neutropenia associada a monocitose;
- c) As PI's apresentaram maior resposta imune celular, fagocitando as bactérias porém com menor taxa destruição e liberação de radicais livres;
- d) As PI foram menos eficientes na eliminação de microorganismos devido ao menor número de linfócitos e títulos mais baixos de anticorpos específicos contra as viroses respiratórias.

REFERÊNCIAS

- AVCI, OGUZHAN; YAVRU, SIBEL; BULUT, O. Changes in Hematological Parameters in Cattle Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. **Acta Scientiae Veterinariae Brasil**, v. 42, n. 1, p. 1–5, 2014.
- BREWOO, J. N.; HAASE, C. J.; SHARP, P.; SCHULTZ, R. D. Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 3–4, p. 369–374, 2007.
- CAMPBELL, J. R. Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 39–50, 2004.
- CHASE, C. C. L. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 52–60, 2013.
- CHASE, C. C. L.; THAKUR, N.; DARWEESH, M. F.; MORARIE-KANE, S. E.; RAJPUT, M. K. Immune response to bovine viral diarrhea virus — looking at newly defined targets. **Animal health research reviews**, v. 16, n. 1, p. 4–14, 2015.
- LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIDPATH, J. E.; NEILL, J. D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 388–396, 2004.
- LIEBLER-TENORIO, E. M. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell Publishing, 1a ed., cap. 7, p. 121-135, 2005.
- MULLER-DOBLIES, D.; ARQUINT, A.; SCHALLER, P.; HEEGAARD, P. M. H.; HILBE, M.; ALBINI, S.; ABRIL, C.; TOBLER, K.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E.; ACKERMANN, M.; METZLER, A. Innate Immune Responses of Calves during Transient Infection with a Noncytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 2, p. 302–312, 2004.
- PICCININI, R.; LUZZAGO, C.; FRIGERIO, M.; FRIGERIO, V.; LIANDRIS, E.; ZECCONI, A. Comparison of blood non-specific immune parameters in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) persistently infected and in immune heifers (vol 53, pg 62, 2006). **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, n. 5, p.62-67, 2006.
- POTGIETER, L. N. Immunology of bovine viral diarrhea virus. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 11, n. 3, p. 501–520, 1995.
- POTGIETER, L. N. D. Bovine Respiratory Tract Disease Caused by Bovine Viral Diarrhea Virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 471–481, 1997.

SILVA, C. P. C. **Imunidade inata no sangue e secreção mamária de vacas Holandesas no período periparto**, 2014. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

STOKSTAD, M.; LOKEN, T. Pestivirus in cattle: Experimentally induced persistent infection in calves. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 10, p. 494–501, 2002.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

THAKUR, N.; BRAUN, L.; CHASE, C.C.L. Effect of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection on neutrophil survival and surface marker expression. Abstract 71P. **95th Annual Meeting of the Conference for Research Workers in Animal Disease**, Chicago IL, 7-9 Dezembro, 2014.

WALZ, P. H.; BELL, T. G.; STEFICEK, B. A.; KAISER, L.; MAES, R. K.; BAKER, J. C. Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 505–514, 1999.

WOOD, R. D.; GOENS, D.; CARMAN, P. S.; DEREGT, D.; JEFFERSON, B.; JACOBS, R. M. Effect on hematopoietic tissue of experimental infection of calves with noncytopathic type 2 bovine viral diarrhea virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 1, p. 42–48, 2004.

13 CONCLUSÃO GERAL

As fêmeas persistentemente infectados tiveram mais diarreia, BRD, produziram menos leite, apresentaram altas contagens de células somáticas e apresentaram menor desempenho reprodutivo em relação as NI. Nas PI's a resposta imune celular foi exacerbada, e as fêmeas foram menos eficientes na eliminação de microorganismos devido ao menor número de linfócitos e títulos mais baixos de anticorpos específicos contra as viroses respiratórias. A infecção persistente do BVDV influenciou no perfil clínico, produtivo, reprodutivo, hematológico e do sistema imune.

REFERÊNCIAS

- ALTAMIRANDA, E. A. G.; KAISER, G. G.; MUCCI, N. C.; VERNÁ, A. E.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C. Effect of bovine viral diarrhea virus on the ovarian functionality and in vitro reproductive performance of persistently infected heifers. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 326–332, 2013.
- ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V.; OLIVEIRA, S. A. M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Excreção e transmissão do vírus da diarréia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 736–742, 2009.
- AVCI, OGUZHAN; YAVRU, SIBEL; BULUT, O. Changes in Hematological Parameters in Cattle Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1–5, 2014.
- BACHOFEN, C.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; STALDER, H.; PETERHANS, E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 3–4, p. 258–267, 2010.
- BAKER, J. C. The Clinical Manifestations of Bovine Viral Diarrhea Infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425–445, 1995.
- BERENDS, I. M. G. A.; SWART, W. A. J. M.; FRANKENA, K.; MUSKENS, J.; LAM, T. J. G. M.; VAN SCHAIK, G. The effect of becoming BVDV-free on fertility and udder health in Dutch dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 84, n. 1–2, p. 48–60, 2008.
- BOOKER, C. W.; ABUTARBUSH, S. M.; MORLEY, P. S.; GUICHON, P. T.; WILDMAN, B. K.; JIM, G. K.; SCHUNICHT, O. C.; PITTMAN, T. J.; PERRETT, T.; ELLIS, J. A.; APLEYARD, G.; HAINES, D. M. The effect of bovine viral diarrhea virus infections on health and performance of feedlot cattle. **The Canadian veterinary journal** v. 49, n. 3, p. 253–260, 2008.
- BREWOO, J. N.; HAASE, C. J.; SHARP, P.; SCHULTZ, R. D. Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 3–4, p. 369–374, 2007.
- BRODERSEN, B. W. Bovine Viral Diarrhea Virus Infections. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 453–464, 2014.
- CAMPBELL, J. R. Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 39–50, 2004.

CHASE, C. C. L.; THAKUR, N.; DARWEESH, M. F.; MORARIE-KANE, S. E.; RAJPUT, M. K. Immune response to bovine viral diarrhea virus- looking at newly defined targets. **Animal health Research Reviews**, v. 16, n. 1, p. 4–14, 2015.

CORNISH, T. E.; VAN OLPHEEN, A. L.; CAVENDER, J. L.; EDWARDS, J. M.; JAEGER, P. T.; VIEYRA, L. L.; WOODARD, L. F.; MILLER, D. R.; O'TOOLE, D. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 2, p. 110–117, 2005.

COURTENAY, A. E.; HENDERSON, R. G.; CRANWELL, M. P.; SANDVIK, T. BVD virus type 2 infection and severe clinical disease in a dairy herd. **Veterinary Record**, v. 160, n. 20, p. 706–707, 2007.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 8–13, 2013.

FLORES, E. F.; GIL, L. H. G. V; BOTTON, S. A.; WEIBLEN, R. Clinical , pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. v. 77, 2000. FRAY, M. D.; PATON, D. .; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 615–627, 2000.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil Viral - histórico , situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125–134, 2005.

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

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 diarrhea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 2, p. 117–124, 2009.

GANHEIM, C.; JOHANNISSON, P.; WALLER, K. P. Changes in Peripheral Blood Leucocyte Counts and Subpopulations after Experimental Infection with BVDV and / or Mannheimia haemolytica. **Journal of Veterinary Medicine**, p. 380–385, 2005.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. Immunology of chronic BVDV infections. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 26–30, 2013.

GIVENS, M. D.; NEWCOMER, B. W. Perspective on BVDV control programs. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, n. 1, p. 78–82, 2015.

GROOMS, D.L.; WARD, L. AA.; BROOK, K.V., Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **American Journal Veterinary Research**, v.57, p.830-833, 1996.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America**, v. 20, n. 1, p. 5–19, 2004.

HANON, J. B.; VAN DER STEDE, Y.; ANTONISSEN, A.; MULLENDER, C.; TIGNON, M.; VAN DEN BERG, T.; CAIJ, B. Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea (bvd) control programme: Appropriate interpretation of real-time RT-PCR and Antigen-ELISA test results. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 2, p. 156–162, 2012.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2–3, p. 89–107, 1999.

LANYON, S. R.; HILL, F. I.; REICHEL, M. P.; BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 201–209, 2014.

LAUREYNS, J.; PIEPERS, S.; RIBBENS, S.; SARRAZIN, S.; DE VliegHER, S.; VAN CROMBRUGGE, J. M.; DEWULF, J. Association between herd exposure to BVDV-infection and bulk milk somatic cell count of Flemish dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 1–2, p. 148–151, 2013.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n.9, p.678-689, 2007.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; LANWEHR, A.; GREISER-WILKE, I.; LOEHR, B. I.; POHLENZ, J. Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 1–2, p. 163–174, 2000.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIDPATH, J. E.; NEILL, J. D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 388–396, 2004.

LIEBLER-TENORIO, E. M. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell Publishing, 1a ed., cap. 7, p. 121-135, 2005.

LINDBERG, A.L. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control: A review. **Veterinary Quarterly**, v.25, p.1-16, 2003.

MOLINA, V.; RISALDE, M. A.; SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J.; ROMERO-PALOMO, F.; PEDRERA, M.; GARFIA, B.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Cell-mediated immune

response during experimental acute infection with bovine viral diarrhoea virus: Evaluation of blood parameters. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 1, p. 44–59, 2012.

MULLER-DOBLIES, D.; ARQUINT, A.; SCHALLER, P.; HEEGAARD, P. M. H.; HILBE, M.; ALBINI, S.; ABRIL, C.; TOBLER, K.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E.; ACKERMANN, M.; METZLER, A. Innate Immune Responses of Calves during Transient Infection with a Noncytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus Innate Immune Responses of Calves during Transient Infection with a Noncytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 2, p. 302–312, 2004.

OIE-World Organisation for Animal Health. Bovine Viral Diarrhoea. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, Chapter 2.4.7, 2015.

OLAFSON, P.; MacCALLUM, A. D.; FOX, F. H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinarian**. v.36, p. 205-213, 1946.

PICCININI, R.; LUZZAGO, C.; FRIGERIO, M.; FRIGERIO, V.; LIANDRIS, E.; ZECONI, A. Comparison of blood non-specific immune parameters in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) persistently infected and in immune heifers (vol 53, pg 62, 2006). **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, n. 5, p.62-67, 2006.

PINTO, V. S. C.; **Impacto da diarreia viral bovina na produção in vitro de embriões**. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio)- Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 2016.

POTGIETER, L. N. D. Bovine Respiratory Tract Disease Caused by Bovine Viral Diarrhea Virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 471–481, 1997.

RADOSTITS, O. M.; LITTLEJOHNS, I. R. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 29, n. 6, p. 513–28, 1988.

RICHTER, V.; LEBL, K.; BAUMGARTNER, W.; OBRITZHAUSER, W.; KÄSBOHRER, A.; PINIOR, B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Journal**, v. 220, n. June 2016, p. 80–87, 2017.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 105-121, 2010.

RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; CHASE, C. C. L. Impact of BVDV infection of white-tailed deer during second and third trimesters of pregnancy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 3, p. 758–62, 2012.

RIDPATH, JULIA F, FALKENBERG, S. M.; BAUERMANN, F. V; VANDERLEY, B. L.; DO, Y.; EDUARDO, F.; RODMAN, D. M.; NEILL, J. D. Comparison of acute infection of calves exposes to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhea virus or a

HoBi-like virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 3, p. 438–442, 2013.

RODNING, S. P.; GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D.; ZHANG, Y.; RIDDELL, K. P.; GALIK, P. K.; HATHCOCK, T. L.; GARD, J. A.; PREVATT, J. W.; OWSLEY, W. F. Reproductive and economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus into a naive group of heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1508–1516, 2012.

ROLA, J. Bulk tank milk somatic cell counts in dairy herds with different bovine viral diarrhoea virus status in Poland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 116, n. 1–2, p. 183–187, 2014.

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America**, v. 20, n. 1, p. 69–83, 2004.

SCHIRRMEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3647–3652, 2004.

SHIN, T.; ACLAND, H. Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 2, n. 2, p. 81–84, 2001.

SILFLOW, R. M.; DEGEL, P. M.; HARMSSEN, A. G. Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 129–139, 2005.

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**, n. May, p. 1–8, 2017.

SMIRNOVA, N. P.; WEBB, B. T.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; VAN CAMPEN, H.; ANTONIAZZI, A. Q.; MORARIE, S. E.; HANSEN, T. R. Development of fetal and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhea virus. **Virus Research**, v. 167, n. 2, p. 329–336, 2012.

STOKKA, G. L. Prevention of respiratory disease in cow/calf operations. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 229–241, 2010.

STOKSTAD, M.; LOKEN, T. Pestivirus in cattle: Experimentally induced persistent infection in calves. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 10, p. 494–501, 2002.

TEICHMANN, U.; LIEBLER-TENORIO, E. M.; POHLENZ, J. E. Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and

advanced phases of experimentally induced mucosal disease in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 2, p. 174–182, 2000.

THAKUR, N.; BRAUN, L.; CHASE, C.C.L. Effect of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection on neutrophil survival and surface marker expression. Abstract 71P. **95th Annual Meeting of the Conference for Research Workers in Animal Disease**, Chicago IL, 7-9 Dezembro, 2014.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P.; TREMBLAY, R.; SCOTT, H. M.; WHITING, T. Production Effects of Pathogens Causing Bovine Leukosis, Bovine Viral Diarrhea, Paratuberculosis, and Neosporosis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 659–669, 2007.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

TSCHOPP, A.; DEISS, R.; ROTZER, M.; WANDA, S.; THOMANN, B.; SCHÜPBACH-REGULA, G.; MEYLAN, M. A matched case-control study comparing udder health, production and fertility parameters in dairy farms before and after the eradication of Bovine Virus Diarrhoea in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 144, p. 29–39, 2017.

VANDERLEY, B.; RIDPATH, J.; SWEIGER, S. Brief research reports Comparison of detection of Bovine virus diarrhea virus antigen in various types of tissue and fluid samples collected from persistently infected cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 84–86, 2011.

WAAGE, S. Influence of new infection with bovine virus diarrhoea virus on udder health in Norwegian dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 43, p. 123–135, 2000.

WALDNER, C. L.; KENNEDY, R. I. Associations between health and productivity in cow-calf beef herds and persistent infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 7, p. 916–927, 2008.

WALZ, P. H.; BELL, T. G.; STEFICEK, B. A.; KAISER, L.; MAES, R. K.; BAKER, J. C. Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 505–514, 1999.

WALZ, P.; GROOMS, D. L.; PASSLER, T.; RIDPATH, J. F.; TREMBLAY, R.; STEP, D.; CALLAN, R.; MD, G. Control of bovine viral diarrhea virus in ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 476–486, 2010.

WOOD, R. D.; GOENS, D.; CARMAN, P. S.; DEREGT, D.; JEFFERSON, B.; JACOBS, R. M. Effect on hematopoietic tissue of experimental infection of calves with noncytopathic type 2 bovine viral diarrhea virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 1, p. 42–48, 2004.

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. Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with “HoBi”-like Pestivirus in a Field Outbreak. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 1, p. 92–100, 2016.

ZIMMER, G. M.; VAN MAANEN, C.; DE GOEY, I.; BRINKHOF, J.; WENTINK, G. H. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3–4, p. 145–149, 2004.

APÊNDICE A

Resultados do RT-PCR e a genotipagem do BVDV-2 identificado nesta pesquisa.

Identificação PI	RT-PCR	Sequenciamento
8687	Positivo	BVDV-2
8739	Negativo	Não analisado
8750	Positivo	BVDV-2
8752	Positivo	BVDV-2
8767	Positivo	BVDV-2
8835	Positivo	BVDV-2
9079	Positivo	BVDV-2
9112	Negativo	Não analisado
9136	Negativo	Não analisado
9198	Negativo	Não analisado
9365	Positivo	BVDV-2
9691	Positivo	BVDV-2
9752	Negativo	Não analisado
9798	Positivo	BVDV-2
10064	Positivo	BVDV-2
10377	Negativo	Não analisado
10400	Positivo	BVDV-2
10751	Positivo	BVDV-2
10999	Positivo	BVDV-2
11014	Positivo	BVDV-2
11146	Positivo	BVDV-2
11189	Positivo	BVDV-2
11527	Positivo	BVDV-2
11537	Positivo	BVDV-2
11562	Positivo	BVDV-2

Curva de amplificação do RT-PCR utilizando o kit BioGene BVD- Bioclin, com os controles positivos e as amostras processadas.

Árvore filogenética das amostras positivas para o BVDV-2 baseado no sequenciamento da região 5'UTR

Figure. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model [1]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates [3] is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed [3]. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 70% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches [3]. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0,5435)). The analysis involved 16 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. There were a total of 339 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [2].

APÊNDICE B

Resultados da soroneutralização dos animais persistentemente infectados identificados nesta pesquisa.

Identificação PI	Soroneutralização BVDV
8687	Negativo
8739	Negativo
8750	Negativo
8752	Negativo
8767	Negativo
8835	Negativo
9079	Negativo
9112	Negativo
9136	Negativo
9198	Negativo
9365	Negativo
9691	Negativo
9752	Soropositiva (4,3)
9798	Negativo
10064	Negativo
10377	Negativo
10400	Negativo
10751	Negativo
10999	Negativo
11014	Negativo
11146	Negativo
11189	Negativo
11527	Soropositiva (3,3)
11537	Negativa
11562	Soropositiva (7,3)

ANEXO A

Reagentes

PBS 10x concentrado

Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	26,79g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	4,14g
NaCl	82g
Água destilada	1000 mL

Preparo: Pesar os sais separadamente; Colocar os sais no balão ou proveta, diluir em água destilada qsp 1L. Transferir para litros de vidro 1L. Ajustar o pH 7,2-7,4.

PBS Solução de uso 1x

Diluir a solução concentrada 10X (1:9) em água Mili-Q. Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

PBS Solução de uso 2x

Diluir a solução concentrada 10X (2:8) em água Mili-Q.

PBS suplementado com Soro Fetal Bovino (SF) a 10%

PBS	900 mL
SFB inativado	100 mL
OBS: inativado.	

PBS para lavagem bactérias

NaCl	8g
Fosfato monobásico de potássio	0,2g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2,8g
KCl	0,2g
Água destilada q.s.p	1000mL

Acertar o pH 7,4

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

DCFH – Solução de estoque a 25 mM

DCFH	24,35 mg
Etanol	2 mL

DCFH – Solução de uso

DCFH	100 ul da sol. mãe
PBS	8,2 ml

EDTA 3 mM

EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ 2H ₂ O PM 372,24 g/mol)	1,12g
PBS (1x)	1000mL