

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA

TESE DE DOUTORADO

**DIRREIA VIRAL BOVINA (BVD) EM BOVINOS DO
ESTADO DE SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO
ANATOMOPATOLÓGICA, MOLECULAR E FILOGENÉTICA
DO VÍRUS**

LUCAS MARIAN

LAGES

2026

LUCAS MARIAN

DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD) EM BOVINOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, MOLECULAR E FILOGENÉTICA DO VÍRUS

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Orientadora: Profa. Dra. Renata Assis Casagrande

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

LAGES

2026

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Marian, Lucas
DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD) EM BOVINOS DO
ESTADO DE SANTA CATARINA : CARACTERIZAÇÃO
ANATOMOPATOLÓGICA, MOLECULAR E FILOGÊNÉTICA
DO VÍRUS / Lucas Marian. -- 2026.
107 p.

Orientadora: Renata Assis Casagrande Assis Casagrande
Coorientador: Cláudio Wageck Canal
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2026.

1. Patologia. 2. Doenças Virais. 3. Filogenia. 4.
Bovinocultura. I. Assis Casagrande, Renata Assis
Casagrande. II. Wageck Canal, Cláudio. III. Universidade do
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal. IV. Título.

LUCAS MARIAN

DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD) EM BOVINOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, MOLECULAR E FILOGENÉTICA DO VÍRUS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Banca examinadora:



Profa. Dra. Renata Assis Casagrande
Orientadora
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

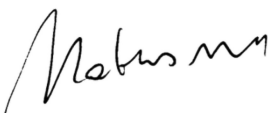
Membros:



Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRP)



Dr. Luan Henker
Kansas State University (USA)



Prof. Dr. Matheus Nunes Weber
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Lages, 12 de fevereiro de 2026

AGRADECIMENTOS

Expresso minha profunda gratidão à Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e, de forma especial, ao Laboratório de Patologia Animal (LAPA) pela estrutura e apoio à pesquisa. Além disso, gostaria de agradecer instituições e laboratórios parceiros: Laboratório de Virologia Veterinária (UFRGS), Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (UDESC), Laboratório de Hemoparasitas e Vetores (UDESC) e Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), pelo apoio prestados por seus integrantes, pela infraestrutura e suporte técnico que viabilizaram este trabalho. Estendo meus agradecimentos às instituições financeiras pelo fomento à ciência: FAPESC (Edital 048/2022 - Nº: 2023TR557), PROAP/CAPES (Código de Financiamento 001), da FAPERGS (23/2551-0002221-4) e CNPq (405786/2022-0). Por fim, agradeço imensamente à minha família e amigos, cujo apoio incondicional, compreensão e incentivo foram o alicerce necessário para a conclusão desta jornada.

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é responsável por expressivas perdas econômicas na bovinocultura mundial, em virtude da ampla diversidade de manifestações clínicas e patológicas associadas à infecção. O objetivo deste projeto foi caracterizar as múltiplas doenças relacionadas ao BVDV em bovinos do estado de Santa Catarina e identificar os biótipos, genótipos e subgenótipos virais. Foram analisados bovinos de corte e de leite com histórico de perdas reprodutivas, malformações, subdesenvolvimento, imunossupressão, bem como afecções digestivas e renais. A abordagem diagnóstica geral contemplou necropsia e exame histopatológico, colheita de soro, sistema nervoso, baço, timo, fígado e rins para múltiplas análises complementares. Para detecção do BVDV, utilizou-se RT-PCR, com os primers 324F/326R da região 5'UTR dos pestivírus. As amostras amplificadas foram submetidas ao sequenciamento genético pelo método Sanger, com posterior análise filogenética para determinação dos genótipos e subgenótipos. Para identificação do biótipo viral, foi realizado cultivo e isolamento viral em células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) e, para detecção de anticorpos contra o BVDV, ELISA indireto. Em um dos cenários investigados, um surto envolvendo BVDV ocorreu em um rebanho de 218 bovinos de corte, resultando em falhas reprodutivas e nascimento de bezerros fracos. Dois neonatos e um feto de 6 meses foram submetidos ao exame anatomopatológico. As principais alterações consistiram em subdesenvolvimento corporal, malformações congênitas, caracterizadas por hipoplasia cerebelar, hidrocefalia e cistos porencefálicos, com disgenesia foliar e neurônios de Purkinje ectópicos. O feto apresentou epicardite, miocardite e miosite linfoplasmocíticas. Amostras dos três casos foram negativas para BVDV por RT-PCR, no entanto, a investigação do rebanho identificou seis bezerros positivos para BVDV em três colheitas consecutivas por RT-PCR, dos quais cinco eram soronegativos e um apresentou baixa titulação de anticorpos no ELISA. A análise filogenética classificou as sequências como BVDV-1b. Em um segundo cenário, foram analisados dois bovinos com idade de 4 e 24 meses, com doença das mucosas. À análise anatomopatológica, havia dermatite, estomatite, glossite, esofagite, ruminite e abomasite erosivas e/ou ulcerativas, além de depleção linfóide em placas de Peyer. A análise filogenética classificou os isolados como BVDV-1b e 1e. As amostras de ambos os bovinos apresentaram efeito citopático em cultivo celular. Adicionalmente, foram investigados três bovinos leiteiros com síndrome nefrótica associada ao BVDV, com idades entre 8 a 24 meses, provenientes de dois rebanhos distintos. Todos apresentavam subdesenvolvimento e imunossupressão. À necropsia, os rins estavam diminuídos, esbranquiçados e com superfície cortical irregular, histologicamente caracterizados por nefrite intersticial linfoplasmocítica e fibrosante, além de glomerulonefrite membranoproliferativa. Depleção linfóide de placas de Peyer, linfonodos e baço também foram observadas. As análises bioquímicas séricas evidenciaram hiperúremia, aumento de creatinina e hipoalbuminemia. A análise filogenética classificou os isolados como BVDV-1a. Houve efeito citopático em cultivo celular em todas as amostras. Os resultados demonstram a ocorrência simultânea de múltiplas afecções em bovinos, incluindo perdas reprodutivas, malformações congênitas, infecção persistente, doença das mucosas e síndrome nefrótica, as quais foram associadas à infecção pelo BVDV-1a, 1b e 1e, sendo esse último subgenótipo de distribuição aparentemente restrita ao estado de Santa Catarina, além da detecção de cepas citopáticas envolvidas.

Palavras-chave: patologia; doenças virais; filogenia; bovinocultura.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is responsible for significant economic losses in the global cattle industry due to the wide diversity of clinical and pathological manifestations associated with infection. The aim of this study was to characterize multiple BVDV-related diseases in cattle from the state of Santa Catarina and to identify viral biotypes, genotypes, and subgenotypes. Beef and dairy cattle with a history of reproductive losses, malformations, poor development, immunosuppression, and digestive and renal disorders were evaluated. The general diagnostic approach included necropsy and histopathological examination, as well as collection of serum, central nervous system, spleen, thymus, liver, and kidney samples for multiple complementary analyses. For BVDV detection, RT-PCR was performed using primers 324F/326R targeting the 5'UTR region of pestiviruses. Amplified products were subjected to Sanger sequencing followed by phylogenetic analysis to determine genotypes and subgenotypes. Viral biotype identification was performed through virus isolation and culture in MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cells, and indirect ELISA was used to detect antibodies against BVDV. In one of the investigated scenarios, a BVDV outbreak occurred in a herd of 218 beef cattle, resulting in reproductive failure and the birth of weak calves. Two neonates and one 6-month-old fetus were submitted for anatomopathological examination. The main findings included poor body development and congenital malformations characterized by cerebellar hypoplasia, hydrocephalus, and porencephalic cysts, with foliar dysgenesis and ectopic Purkinje neurons. The fetus presented lymphoplasmacytic epicarditis, myocarditis, and myositis. Samples from the three cases were negative for BVDV by RT-PCR; however, herd investigation identified six calves positive for BVDV in three consecutive RT-PCR samplings, of which five were seronegative and one showed a low antibody titer by ELISA. Phylogenetic analysis classified the sequences as BVDV-1b. In a second scenario, two cattle aged 4 and 24 months with mucosal disease were evaluated. Anatomopathological examination revealed erosive and/or ulcerative dermatitis, stomatitis, glossitis, esophagitis, ruminitis, and abomasitis, in addition to lymphoid depletion in Peyer's patches. Phylogenetic analysis classified the isolates as BVDV-1b and 1e. Samples from both animals showed cytopathic effects in cell culture. Additionally, three dairy cattle with BVDV-associated nephrotic syndrome, aged 8 to 24 months and originating from two different herds, were investigated. All animals exhibited poor development and immunosuppression. At necropsy, kidneys were reduced in size, pale, and had an irregular cortical surface, histologically characterized by lymphoplasmacytic fibrosing interstitial nephritis and membranoproliferative glomerulonephritis. Lymphoid depletion of Peyer's patches, lymph nodes, and spleen was also observed. Serum biochemical analysis revealed hyperuremia, increased creatinine, and hypoalbuminemia. Phylogenetic analysis classified the isolates as BVDV-1a. Cytopathic effects were observed in cell culture in all samples. The results demonstrate the simultaneous occurrence of multiple disease conditions in cattle, including reproductive losses, congenital malformations, persistent infection, mucosal disease, and nephrotic syndrome, all associated with infection by BVDV-1a, 1b, and 1e, the latter a subgenotype apparently restricted to the state of Santa Catarina, as well as the detection of cytopathic strains involved.

Keywords: pathology; viral diseases; phylogeny; cattle production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

Figura 1. Developmental abnormalities in calves from a beef cattle herd affected by a BVDV-1b outbreak in Southern Brazil. Neonate 1: A – brain: small vestigial cerebellar protrusions (highlights). B – parietal cortex in cross-section: pronounced hydrocephalus characterized by dilation of the lateral ventricles (asterisk), as well as discrete multifocal porencephalic cysts in the parietal cortex (arrow); C – moderate focal porencephalic cyst in the occipital cortex (arrow). Neonate 2: D - severe underdevelopment (ruler: 20 cm)42

Figura 2. Histological lesions in the cerebellum of a neonate calf from a beef cattle herd affected by a BVDV-1b outbreak in Southern Brazil. (A) Dysgenesis of the cerebellar folia (arrows), associated with replacement by solid white matter (asterisks). (B) Segmental hypoplasia of the Molecular (M), Purkinje (P), and Granular (G) layers, along with ectopic Purkinje neurons with irregular distribution in the granular layer. .45

Figura 3. Phylogenetic tree constructed from the 5'UTR region of the viral genome of Pestivirus, using sequences from persistently infected (PI) calves, as well as from reference strains, both Brazilian and international, of Pestivirus bovis, P. tauri, and P. giraffae, analyzed by the Maximum Likelihood method with bootstrap analysis of 500 repetitions and the Kimura 2-parameter model. The strains isolated in this study are highlighted in the tree with a distinctive symbol (●).47

CAPÍTULO III

Figura 1. Lesões macroscópicas em bovinos acometidos pela doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **A - Dígito (Bov. 1):** ulceração de até 5 cm e deposição de crostas em pele da fenda interdigital (seta) e banda coronária. **B - Plano nasal (Bov. 1):** deposição de crostas (seta) e ulcerações de até 4 cm que se estendem até a junção mucocutânea (asterisco). **C – Palato duro (Bov. 1):** erosões circulares de 1 a 3 cm em mucosa (setas). **D - Língua (Bov. 1):** ulcerações lineares de 0,5 a 2 cm em face dorsal (seta). **E - Esôfago (Bov. 1):** erosões e ulcerações lineares de 0,5 a 2 cm em mucosa (setas). **F - Rúmen (Bov. 1):** erosões e ulcerações circulares de até 0,5 a 1 cm em mucosa, predominantemente em pilares ruminais (seta). **G - Rúmen (Bov. 2)** ulcerações lineares que variavam de 5 a 15 cm na região dos pilares (setas). **H - Abomaso (Bov. 2):** erosões puntiformes de até 0,2 cm na mucosa (setas). **I – Íleo (Bov. 2):** placa de Peyer evidentes e aumentadas (setas). 57

Figura 2. Lesões histológicas em bovinos acometidos pela doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **A - Língua (Bov. 1):** ulceração do epitélio de revestimento, acompanhada por infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de restos necróticos e exsudação fibrinosa (setas). **B - Esôfago (Bov. 1):** erosão da mucosa, acompanhada por infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos (setas). **C - Rúmen (Bov. 2):** ulceração da mucosa, acompanhada por infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos e exsudação fibrinosa (setas). **D - Íleo (Bovino 2):** em placas de Peyer, perda da arquitetura linfocitária e formação de cavitações na região central de folículos

linfóides, revestidas internamente por epitélio achatado e microvilosidades curtas (setas).58

Figura 3. Árvore filogenética baseada na região 5'UTR do genoma viral dos pestivírus, utilizando sequências proveniente de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV, bem como sequências brasileiras e internacionais dos Pestivirus bovis (BVDV-1), Pestivirus tauri (BVDV-2) e Pestivirus giraffae, analisada pelo método Maximum Likelihood com 1000 bootstraps e modelo Kimura 2-parâmetros. As sequências detectadas neste estudo foram destacadas pelo símbolo distintivo (●).60

Figura 4. Cultivo celular e isolamento viral em células MDBK com amostras de bovinos infectados pelo BVDV-1b e 1e no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **A – Cultivo controle:** tapete celular íntegro. **B - Bovino 1:** efeito citopático inicial, com aparecimento de placas celulares 96h pós-inoculação (setas). **C – Bovino 2:** intensificação e difusão das placas celulares na garrafa 72h pós-inoculação.....61

CAPÍTULO IV

Figura 1. Lesões macroscópicas em rins de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Bovino 1:** rins moderadamente diminuídos, firmes e esbranquiçados, com áreas de retração do parênquima, entremeadas a nodulações parenquimatosas que variavam de 0,1 a 0,5 cm em superfície capsular (setas). **B – Bovino 1:** região cortical e medular com áreas de coloração heterogênea variando de castanho a esbranquiçado (setas). **C – Bovino 2:** rins acentuadamente diminuídos e esbranquiçados, com retração do parênquima, entremeada a nodulações parenquimatosas de 0,1 a 0,3 cm (setas). **D – Bovino 2:** em corte dorsal, estriações esbranquiçadas em região cortical (setas). **E – Bovino 3:** rins moderadamente esbranquiçados, com retração do parênquima, entremeada a nodulações parenquimatosas de 0,5 a 1 cm (setas); rim direito moderadamente diminuído em relação ao contralateral (asterisco). **F – Bovino 3:** em corte dorsal, áreas esbranquiçadas (seta) em rim direito.75

Figura 2. Lesões macroscópicas secundárias em bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Pulmão (Bov. 1):** área de consolidação do parênquima pulmonar na região anteroventral acometendo cerca de 50% do lobo cranial esquerdo. **B – Fígado (Bov. 2):** ducto biliar ectásico e com paredes espessadas (seta amarela), com exemplares adultos de Fasciola hepatica (setas vermelhas). **C – Íleo (Bov. 2):** placa de Peyer evidente e aumentada (setas). **D – Íleo (Bov. 2):** placas de Peyer, em corte transversal, cavitações de até 0,5 cm (setas).77

Figura 3. Lesões histológicas observadas em rins de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Bov. 1:** fibrose intersticial acompanhada por infiltrado linfoplasmocítico (asteriscos). **B – Bov. 2:** segmentação glomerular (setas vermelhas) acompanhada por proliferação de células mesangiais (asterisco) e aderência do tufo glomerular ao folheto parietal da cápsula de Bowman (setas amarelas). **C – Bov. 2:** colapso segmentar do tufo glomerular (asterisco), com formação de pseudocrescente

(setas). **D - Bov. 1:** glomérulo completamente hialinizado (asterisco). **E - Bov. 3:** múltiplos túbulos renais atróficos (setas). **F - Bov. 2:** hipertrofia de túbulos renais remanescentes que se projetam e deformam a superfície cortical (setas). **G - Bov. 2:** dilatação tubular e acúmulo de gotas e cilindros hialinos (setas). **H - Bov. 2:** espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares evidenciados pela técnica Periodic Acid–Schiff – PAS (setas). **I - Bov. 3:** fibrose intersticial (setas vermelhas) e periglomerular (seta amarela) demonstrada pela técnica Tricrômico de Masson.....79

Figura 4. Lesões histológicas em tecidos linfoides de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Jejunio (Bov. 1):** substituição parcial de folículo linfoide de placa de Peyer por criptas intestinais herniadas através da submucosa (setas). **B – Íleo (Bov. 2):** folículo linfoide substituído por cavidade revestida por epitélio pavimentoso, contendo muco, restos necróticos e infiltrado de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (asterisco). **C – Placa de Peyer (Bov. 3):** formação de corpos apoptóticos livres e fagocitados por macrófagos de corpo tingível (setas). **D – Baço (Bov. 1):** apoptose de linfócitos em folículo linfoide (asterisco).....81

Figura 5. A árvore filogenética baseada na região 5'UTR do genoma viral dos pestivírus, utilizando as sequências provenientes dos bovinos acometidos por síndrome nefrótica associada à doença das mucosas atípica, bem como sequências brasileiras e internacionais dos *Pestivirus bovis* (BVDV-1), *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus giraffae*, analisada pelo método Maximum Likelihood com 1000 bootstraps e modelo Kimura 2-parâmetros. As sequências detectadas neste estudo foram destacadas pelo símbolo distintivo (●).82

Figura 6. Cultivo celular e isolamento viral em células MDBK com amostras de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Cultivo controle:** tapete celular íntegro. **B - Bovino 1:** placas celulares (setas) em aumento progressivo às 120h pós-inoculação. **C – Bovino 2:** surgimento de placas (setas) em pequenas regiões da garrafa às 72h pós-inoculação. **D – Bovino 3:** placas em aumento progressivo (setas) às 96h pós-inoculação.84

CAPÍTULO V

Figura 1. Municípios de Santa Catarina com ocorrência de bovinos acometidos por doenças associadas ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV).90

Figura 2. Árvore filogenética baseada na região 5'UTR do genoma viral dos pestivírus, utilizando todas as sequências de todos os bovinos infectados pelo BVDV detectados neste estudo, bem como sequências brasileiras e internacionais dos *Pestivirus bovis* (BVDV-1), *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus giraffae*, analisada pelo método *Maximum Likelihood* com análise *bootstrap* de 500 repetições e modelo Kimura 2-parâmetros. As sequências detectadas neste estudo foram destacadas pelo símbolo distintivo (●).91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Outbreak of persistent Infection, Abortions, and congenital malformations associated with BVDV-1b in beef cattle from Santa Catarina state, Southern Brazil. 46

Tabela 2. Outbreak of BVDV-1b infection in beef cattle from Santa Catarina State, Southern Brazil. Molecular analyses targeting the investigation of agents potentially responsible for abortion and malformations in cattle46

CAPÍTULO III

Tabela 1. Distribuição e gravidade das lesões anatomopatológicas observadas em bovinos com doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil.59

Tabela 2. Análise comparativa de similaridade nucleotídica entre sequências de nacionais e internacionais do BVDV-1 depositadas no GenBank com as sequências obtidas de bovinos com doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil.59

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Níveis séricos de analitos relacionados à função renal em bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV.73

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.2	OBJETIVO GERAL	15
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO I.....		16
1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.2	HISTÓRICO E AGENTE ETIOLÓGICO.....	17
1.3	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	19
1.4	INFECÇÃO AGUDA OU TRANSITÓRIA.....	19
1.5	EFEITOS NO SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	20
1.6	EFEITOS NO SISTEMA REPRODUTOR.....	22
1.7	MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS	24
1.8	INFECÇÃO PERSISTENTE.....	25
1.9	DOENÇA DAS MUCOSAS.....	26
1.10	SÍNDROME NEFRÓTICA.....	26
1.11	EFEITOS NO SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	27
1.12	EPIDEMIOLOGIA	28
1.13	DIAGNÓSTICO	30
3.11.1	Isolamento Viral (IV).....	31
3.11.2	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	31
3.11.3	Imuno-Histoquímica (IHQ)	32
3.11.4	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR).....	33
3.11.5	Sequenciamento Genético e Filogenia.....	34
3.11.6	Outras Técnicas Moleculares.....	34
3.12	CONTROLE E PREVENÇÃO	35
CAPÍTULO II.....		38
1.	ARTIGO 1: OUTBREAK OF BVDV-1b ASSOCIATED WITH PERSISTENT INFECTION, REPRODUCTIVE LOSSES, AND CONGENITAL MALFORMATIONS IN BEEF CATTLE IN SOUTHERN BRAZIL	39
1.1	INTRODUÇÃO.....	40
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	41
1.3	RESULTADOS	42
1.4	DISCUSSÃO	43
1.5	CONCLUSÃO	47
CAPÍTULO III.....		50
1.	MANUSCRITO 2: DOENÇA DAS MUCOSAS ASSOCIADA AO BVDV-1b E 1e EM BOVINOS DO SUL DO BRASIL	51
1.1	INTRODUÇÃO.....	53
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	54
1.2.1	Caracterização dos Casos e Exame Anatomopatológico	54
1.2.2	Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética	54
1.2.3	Cultivo e Isolamento Viral.....	55
1.3	RESULTADOS	56
1.3.1	Caracterização dos Casos e Exame Anatomopatológico	56
1.3.2	Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética	59
1.3.3	Cultivo e Isolamento Viral.....	60
1.4	DISCUSSÃO	61
1.5	CONCLUSÃO	65
CAPÍTULO IV		66

1.	MANUSCRITO 3: SÍNDROME NEFRÓTICA ASSOCIADA AO BVDV-1a EM BOVINOS LEITEIROS NO BRASIL	67
1.1	INTRODUÇÃO.....	69
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	70
1.2.1	Caracterização dos Casos e Exame Anatomopatológico	70
1.2.2	Exame Bioquímico Sérico	71
1.2.3	Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética	71
1.2.4	Cultivo e Isolamento Viral.....	72
1.3	RESULTADOS	73
1.3.1	Caracterização Clínica e Anatomopatológica	73
1.3.2	Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética	81
1.3.3	Cultivo e Isolamento Viral.....	83
1.4	DISCUSSÃO	84
1.5	CONCLUSÃO	88
	CAPÍTULO V	89
1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
2.	REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma atividade de grande importância econômica e social em diversos países, com significativa contribuição para o abastecimento alimentar, a geração de empregos e a produção de insumos agroindustriais (HOCQUETTE et al., 2018). Nesse contexto, as doenças infecciosas configuram gargalos importantes ao impactarem diretamente na produtividade animal e representam um dos principais desafios enfrentados pelos pecuaristas (RICHTER et al., 2017).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), gênero *Pestivirus* e família *Flaviviridae*, é reconhecido como um dos principais patógenos da bovinocultura mundial (LANYON et al., 2014). Produz impacto econômico global ocasionado por perdas diretas relacionadas às altas taxas de morbidade e mortalidade e diminuição do desempenho produtivo e reprodutivo (RICHTER et al., 2017). O nascimento de bezerros fracos, subdesenvolvidos e com malformações congênitas, os animais persistentemente infectados (PI), o desenvolvimento da doença das mucosas e a imunossupressão, favorecendo infecções secundárias estão entre os principais efeitos ocasionados pela infecção pelo BVDV (SANTMAN-BERENDS et al., 2015).

Devido à importância econômica da infecção pelo BVDV, muitos países estabeleceram medidas eficazes de controle e erradicaram o vírus de seus rebanhos (SCHWEITZER et al., 2021). No Brasil, apesar de possuir um rebanho de aproximadamente 238,6 milhões de cabeças (IBGE, 2023), com status de maior exportador e maior produtor de carne bovina, bem como terceiro maior produtor de leite do mundo, não há um programa de controle e erradicação BVDV estabelecido no país, o qual encontra-se amplamente distribuído e com ampla variabilidade genética (MOSENA et al., 2022). A ocorrência de pestivírus acometendo bovinos é bem documentada no Nordeste (SILVEIRA et al., 2018), no Norte (BAUMBACH et al., 2023) e no Sul, onde o BVDV é frequentemente detectado nos rebanhos bovinos, sobretudo no estado do Rio Grande do Sul (WEBER et al., 2014; MOSENA et al., 2022).

Em Santa Catarina, a ocorrência do BVDV é subestimada, com raros relatos de identificação e caracterização do vírus (SILVEIRA et al., 2017; FLORES et al. 2018; MOSENA et al., 2022; MARIAN et al., 2024). A primeira detecção em bovinos no estado ocorreu em 1997, quando o BVDV-2b foi identificado em um rebanho com distúrbios reprodutivos (FLORES et al., 2018). O BVDV-1 foi relatado pela primeira vez no estado em 2012, com detecção dos subgenótipos 1a, 1b e 1e (SILVEIRA et al., 2017). Em

2018, uma nova detecção do subgenótipo 1e ocorreu (MOSENA et al. 2022). Até 2023, todos os isolados do BVDV-1 em Santa Catarina foram detectados em amostras de líquido folicular recuperados em abatedouros, até que no mesmo ano, o BVDV-1e e BVDV-2b foram associados a múltiplos abortamentos em diferentes regiões do estado (MARIAN et al. 2024).

Santa Catarina apresenta um cenário distinto do nacional, no qual há ampla ocorrência de pestivírus até então não detectados no estado. Estudos recentes demonstram a detecção do *Pestivirus brasiliense* em monitoramentos regionais, bem como associado a apresentações clínicas variadas em diferentes regiões do Brasil (WEBER et al., 2016; BAUMBACH et al., 2023). Em contrapartida, Santa Catarina mantém o status nacional de único estado em que há detecção do BVDV-1e, predominantemente observado na Europa (YESILBAG et al., 2017; MOSENA et al., 2022; MARIAN et al., 2024). Esse panorama evidencia que o estado possui um perfil epidemiológico próprio quanto à circulação de pestivírus, distinto daquele observado em outras regiões brasileiras (MOSENA et al., 2022).

Apesar de conhecida circulação do BVDV no Sul e nas demais regiões do país, são escassas as informações a respeito dos efeitos do vírus sobre a saúde e desempenho dos bovinos no estado de Santa Catarina. Dessa forma, a associação de ferramentas diagnósticas, como a análise anatomopatológica, sorológica, virológica, molecular e filogenética, é essencial para identificação e tipificação dos biótipos, genótipos e subgenótipos que circulam pelo estado, bem como a caracterização das manifestações clínicas e patológicas associadas.

1.2 OBJETIVO GERAL

Determinar, por meio das análises anatomopatológica, virológica, sorológica, molecular e filogenética, a presença do BVDV em bovinos acometidos por doenças clínico-patológicas compatíveis com a infecção viral em bovinos de Santa Catarina, bem como determinar os biótipos, os genótipos e os subgenótipos.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar, por meio da RT-PCR, a presença do BVDV em bovinos com síndromes clínico-patológicas compatíveis com a infecção viral.
- b. Caracterizar o quadro anatomopatológico dos bovinos infectados por BVDV.
- c. Caracterizar os genótipos e subgenótipos do BVDV em bovinos acometidos, utilizando o sequenciamento parcial.
- d. Determinar os biótipos, por meio do isolamento e cultivo celular, das cepas detectadas em bovinos acometidos por doenças clínico-patológicas associadas ao BVDV

CAPÍTULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2 HISTÓRICO E AGENTE ETIOLÓGICO

A doença conhecida como Diarreia Viral Bovina (BVD) foi inicialmente descrita em 1946, na América do Norte (OLAFSON et al., 1946), com isolamento do vírus depois de mais de uma década (LEE & GILLESPIE, 1957). O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, no qual foram agrupadas diferentes espécies capazes de infectar e causar doença em diversos hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens (SMITH et al., 2017). Até o início deste século, o gênero *Pestivirus* era composto por quatro espécies virais distintas, classificadas como: vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1) e tipo 2 (BVDV-2), além do vírus da doença da fronteira (BDV) e vírus da peste suína clássica (CSFV), as quais acometem, principalmente, ruminantes e suínos (BECHER et al., 1999). Desde então, novas espécies de *Pestivirus*, consideradas atípicas, foram identificadas em diferentes espécies animais de diferentes regiões do mundo e inicialmente nomeadas de acordo com os hospedeiros, localização geográfica e características da doença apresentada (SMITH et al., 2017; POSTEL et al., 2021).

A descoberta de novas espécies pertencentes ao gênero *Pestivirus* ao longo das últimas décadas despertou a necessidade de alterar a nomenclatura utilizada até então. Para que isso seja possível, uma proposta formal deve ser submetida ao Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para que haja uma revisão na taxonomia empregada. A primeira proposta de revisão ocorreu em 2017, a qual era constituída por um pedido de inclusão de sete novas espécies, resultando em onze, além de nomear todas as espécies do gênero de acordo com um formato padrão e modificar os critérios pelos quais essas eram batizadas. Na ocasião, a proposta aprovada alterou as nomenclaturas do vírus da diarreia viral bovina tipo 1 e 2, os quais passaram a ser chamados de *Pestivirus A* e *B*, respectivamente, assim como dos demais integrantes do gênero, que foram nomeados de *Pestivirus C* a *Pestivirus K* (SMITH et al., 2017).

Apesar das atualizações recentes, o número crescente de novas sequências de pestivírus catalogadas levou a criação de uma nova proposta de revisão taxonômica. Em 2021, além das 11 espécies já descritas, sugeriu-se a criação de oito novas espécies classificadas de *Pestivirus L* a *Pestivirus S* (POSTEL et al., 2021). Ainda em 2021, o ICTV passou a exigir que todos os nomes de espécies seguissem uma nova

regra, com adoção de um formato binominal em que o nome da espécie deve ser constituído por apenas dois componentes de palavras distintas e separados por um espaço. O primeiro componente do nome deve ser igual ao nome do gênero ao qual a espécie pertence. Já o segundo componente não deve conter nenhum sufixo específico para táxons (ICTV, 2023). Em 2023, modificações foram realizadas na taxonomia de 11 das 19 espécies de pestivírus. A exemplo, os pestivírus de ruminantes foram renomeados como *Pestivirus bovis* (*Pestivirus A* ou BVDV-1), *Pestivirus tauri* (*Pestivirus B* ou BVDV-2) e *Pestivirus braziliense* (*Pestivirus H* ou HoBi-like) (POSTLER et al., 2023).

Além da classificação oficial estabelecida pelo ICTV, a alta variabilidade genética e antigênica observada dentro das espécies de pestivírus levou à subdivisão de algumas delas em subgenótipos (YESILBAG et al., 2017). Três regiões do genoma são frequentemente utilizadas para genotipagem de pestivírus. A 5'UTR é a principal região utilizada pois, embora pequena, apresenta-se altamente conservada intra e interespecies, seguidas pelas sequências de codificação N^{pro} e E2 (SHI et al., 2020; YUAN & WANG, 2021). Para BVDV-1, atualmente são descritos 24 subgenótipos (1a - 1x), enquanto para BVDV-2 há 5 subgenótipos identificados (2a - 2e) (MUCELLINI et al., 2023). Para o *Pestivirus braziliense*, há classificação em 4 subgenótipos (3a - 3d) (GIAMMARIOLI et al., 2015).

As cepas do BVDV podem ser classificadas em dois biótipos, citopático (CP) e não-citopático (NCP), de acordo com os efeitos em cultivo celular. O biótipo CP ocorre, principalmente, por alterações genômicas nas sequências de codificação da proteína estrutural NS2/3, que ao ser clivada, origina as proteínas NS2 e NS3, conferindo à cepa o caráter citopático e a capacidade de causar destruição das células infectadas (NEILL, 2013). O biótipo NCP possui um genoma inalterado, por produzir NS2/3 não clivada e uma pequena quantidade de NS2 e NS3 necessárias para replicação, tornando-o incapaz de causar destruição celular. Este biótipo compreende a maioria das cepas observadas nos rebanhos bovinos, responsável pela ocorrência de infecções agudas e surgimento de animais persistentemente infectados (PI) (LI et al., 2024).

Quanto à organização estrutural, o BVDV é um vírion pequeno, com diâmetro entre 40 e 60nm, capsídeo icosaédrico e envelope de composição lipídica, com genoma composto por RNA de fita simples e sentido positivo de aproximadamente de 12,3kb. O RNA genômico contém um único e grande quadro de leitura aberto (ORF),

flanqueado por regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3' (KOKKONOS et al., 2020). O ORF codifica uma única poliproteína que é processada pós-traducionalmente e origina quatro proteínas estruturais (C, Erns, E1 e E2) e sete proteínas não estruturais (N^{pro}, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (TAUTZ et al., 2015). As proteínas não-estruturais estão relacionadas ao processo de replicação viral, enquanto as proteínas estruturais exercem funções de revestimento e proteção ao RNA viral, além de mediar a entrada e saída das partículas virais das células infectadas (CHI et al., 2022).

1.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Os pestivírus exibem uma certa especificidade em relação aos hospedeiros, contudo, infecções por BVDV em hospedeiros heterólogos foram documentadas logo após sua primeira identificação em bovinos (BECKENHAUER et al., 1961). Desde então, o BVDV foi detectado em diversas espécies, tanto domésticas quanto selvagens, incluindo ovinos, suínos, girafas e camelos, induzindo síndromes caracterizadas por pirexia, diarreia, leucopenia, aborto e imunossupressão (PASSLER & WALZ, 2010). A infecção por BVDV pode manifestar-se de maneiras variadas, desde infecções subclínicas transitórias (NODAR et al., 2023) e persistentes (FRITZEN et al., 2024), com manifestações clínicas e patológicas evidentes nos sistemas nervoso, respiratório, gastrointestinal e reprodutivo (SILVA SILVEIRA et al., 2020; TOKER & YESILBAG, 2021; GOLCHIN et al., 2023; MARIAN et al., 2024).

A gravidade das manifestações clínicas está relacionada a fatores como a idade do animal, momento da infecção, status reprodutivo e imunológico, além do tipo viral e sua virulência (RIDPATH, 2010). O BVDV é bem adaptado aos bovinos e, na maioria dos casos, além de alguns dias de febre e perda de apetite, não há sinais clínicos de infecção aguda, que termina após cerca de duas a três semanas e deixa os animais imunes à reinfeção (MOENNIG & YERNALL, 2021). No entanto, animais infectados podem apresentar diarreia persistente, fezes com sangue ou muco, ulceração da mucosa, distúrbios reprodutivos e temperatura corporal elevada, bem como a ocorrências de doenças do pós-parto, como retenção placentária, metrite e mastite clínica (BASQUEIRA et al., 2020; RIVAS et al., 2022).

1.4 INFECÇÃO AGUDA OU TRANSITÓRIA

A infecção pós-natal por BVDV, caracterizada por curso agudo e transitório, é causada, principalmente, por cepas NCP, as quais são transmitidas direta ou indiretamente por meio do contato com fluidos corporais, incluindo secreção nasal,

urina, leite, sêmen, saliva, lágrimas e fluidos fetais, sobretudo de indivíduos PI (LANYON et al., 2014). Após adentrar no organismo, o BVDV rapidamente replica em células epiteliais locais e tecidos linfoides associados, seguido de viremia transitória que se inicia entre 2 e 3 dias pós infecção (COLINS et al., 2009). A infecção aguda é sempre acompanhada por imunossupressão transitória, podendo ser assintomática ou induzir sinais clínicos transitórios e leves até doença aguda grave, incluindo febre, diarreia, anorexia, distúrbios respiratórios, falha reprodutiva, aumento da suscetibilidade a infecções secundárias (SEONG et al., 2013; PEDDIREDDI et al., 2018; MARIAN et al., 2024). A soroconversão pode ser detectada por volta do 14º dia e, à medida que a imunidade ativa se estabelece, a eliminação do agente ocorre e a detecção do vírus infeccioso em células da camada leucocitária ou em secreções nasais após esse período torna-se insignificante (COLLINS et al., 2009).

1.5 EFEITOS NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

A imunossupressão induzida por BVDV foi identificada em animais naturalmente infectados, com infecção transitória ou persistente, bem como após infecção experimental (WALZ et al., 2020). A primeira barreira a ser transpassada pelo BVDV é a imunidade inata, que atua como uma linha de defesa primária do organismo contra patógenos invasores e reage de maneira rápida às infecções (PANG et al., 2023). Após a infecção, a resposta inata é ativada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que detectam e se ligam a padrões moleculares específicos de patógenos (PAMPs) (CHEN et al., 2023). Os PAMPs, responsáveis por iniciarem uma cascata de sinalização para produção de interferon tipo I (IFN-1) e outras citocinas pró-inflamatórias, já demonstraram atividade desregulada em decorrência da infecção por BVDV (MORALES-AGUIAR et al., 2020). Para prevenir a ativação da resposta imune inata e promover infecção bem-sucedida, a maioria dos pestivírus conta com a proteína não estrutural N^{pro} e a glicoproteína de envelope E^{ns}, que atuam inibindo diversas etapas de transdução de sinal que evitam a sinalização de diferentes subtipos de interferons tipo I (IFN-1), presentes em todas as células nucleadas e essenciais para funções antivirais (MESEV et al., 2019).

Os efeitos imunossupressores do BVDV incluem alterações na composição das células e imunofenótipo alterado de leucócitos e vários defeitos na função das células imunes, resultando em aumento da gravidade da doença de infecções secundárias com outros patógenos (AI-KUBATI et al., 2021). A fagocitose é o elo entre a imunidade

inata e adaptativa, pois leva à degradação do antígeno e subsequente apresentação aos linfócitos para o início da resposta imune adaptativa. A infecção por BVDV é capaz de alterar a viabilidade e atividade funcional de macrófagos e neutrófilos, consideradas as principais células com poder fagocítico (ABDELSALAM et al., 2020; ABDELSALAM et al., 2023). O BVDV prejudica a apresentação do antígeno e evita a imunidade celular através de estímulos distintos (FENG et al., 2023). A presença de mediadores inibitórios e a diminuição da quimiotaxia induzida por citocinas reduzem o poder de fagocitose dos macrófagos, principalmente quando há infecção por cepas de alta virulência (ABDELSALAM et al., 2020). A infecção prejudica a eficácia das células T CD4 e CD8 em estimular respostas imunes adaptativas (RAJPUT et al., 2020), além de regular negativamente as moléculas de MHC I e II nas células apresentadoras de antígenos, como os monócitos e células dendríticas (CHASE, 2013).

A imunossupressão ocasionada pelo BVDV também está relacionada ao aumento da taxa de apoptose de linfócitos T e B, principalmente em timo, folículos de linfonodos e tecido linfoide associado ao intestino (GALT) (PEDRERA et al., 2009; ROMERO-PALOMO et al., 2017). O processo de morte celular é natural e essencial na morfogênese e homeostase tecidual e envolve duas vias regulatórias principais: intrínseca e extrínseca que, por mecanismos distintos, induzem a apoptose pela ativação de caspases efetoras e participação mitocondrial (PEDRERA et al., 2012). As cepas citopáticas do BVDV ativam predominantemente a via intrínseca, que envolve a liberação do citocromo C das mitocôndrias, ativação da caspase-9, e formação do apoptossomo. Além disso, o BVDV pode ativar a via extrínseca, dependente de receptores de morte celular, como Fas e TNF, levando à ativação de caspase-8 (MORALES-AGUIAR et al., 2020). Estudos também mostram que a infecção por BVDV provoca estresse no retículo endoplasmático, o que ativa caspase-12 e desencadeia apoptose, contribuindo para a supressão do sistema imunológico (FENG et al., 2023). Macrófagos infectados pelo BVDV são capazes de liberar citocinas que promovem apoptose em linfócitos e depleção de tecido linfoide com intensidade conforme a virulência da cepa envolvida, independente do biótipo (ABDELSALAM et al., 2020). Tais macrófagos aumentam seu número em tecidos linfoides cerca de 3 dias após a infecção, antes de qualquer sinal de depleção linfoide (PEDRERA et al., 2009).

1.6 EFEITOS NO SISTEMA REPRODUTOR

O acometimento do trato reprodutor, tanto masculino quanto feminino pelo BVDV, está relacionado com as principais perdas econômicas e produtivas ocasionadas pelo vírus (OGUEJIOFOR et al., 2019). A gravidade dos efeitos reprodutivos tende a ser mais impactante em populações bovinas sem imunidade, especialmente durante o período de reprodução (FOUNTAIN et al., 2021). O vírus já foi identificado em diversos componentes teciduais testiculares, ovarianos e uterinos de animais PI, bem como em bovinos transitoriamente infectados (TI) durante longos períodos após resolução do quadro agudo (READ et al., 2020; SIRAG et al., 2022). Entre os efeitos ocasionados no trato reprodutivo da fêmea, pode-se ressaltar o declínio da fertilidade, com redução das taxas de concepção e prenhez em vacas suscetíveis quando a infecção ocorre antes ou no momento da reprodução (OGUEJIOFOR et al., 2019). O vírus já foi associado ao aumento na incidência de perdas embrionárias e fetais, além de natimortalidade e retenção placentária (BASQUEIRA et al., 2020). Fêmeas não prenhes que se recuperam de infecção transitória possuem probabilidade reduzida de concepção por 42–60 dias (FOUNTAIN et al., 2021). Novilhas PI também apresentam baixa taxa de fertilidade, porém contínua, com necessidade de múltiplas inseminações quando submetidas ao manejo reprodutivo artificial, além de maior incidência de perdas gestacionais (BASQUEIRA et al., 2020).

Em matrizes bovinas PI ou agudamente infectadas, o BVDV pode ocorrer em todos os órgãos do trato reprodutor, com acometimento principal do estroma ovariano, incluindo células do cumulus e oócitos em diferentes estágios de maturação, o que possibilita a ocorrência de anormalidades fisiológicas e desregulação hormonal (OGUEJIOFOR et al., 2019; SIRAG et al., 2022). Infecções agudas já foram relacionadas à ocorrência de ooforite e necrose das células da granulosa, além de promover irregularidades no crescimento folicular, alterações nos níveis de estradiol circulante, ocasionando magnitude baixa ou infrequente da liberação de LH, o que consequentemente pode silenciar o estro, além de atrasar ou impedir a ovulação (FRAY et al., 2002; MCGOWAN et al., 2003). A atividade ovariana pode, ainda, ser comprometida pela leucopenia sistêmica, uma vez que leucócitos estão presentes nos ovários durante todo o ciclo e são responsáveis pela liberação de citocinas e mediadores inflamatórios reguladores de atividades ovarianas (FRAY et al., 2002). Em fêmeas PI, o efeito do BVDV sobre as células germinativas ocasiona uma drástica redução na população folicular ovariana (ALTAMIRANDA et al., 2013).

Os efeitos do BVDV sobre a gestação e o desenvolvimento do conceito dependem do estágio gestacional em que a infecção ocorre (HANSEN et al., 2010). Estudos experimentais demonstraram que as perdas causadas pelo vírus durante as fases iniciais de gestação estão associadas à morte embrionária precoce (GARD et al., 2010). Baixas taxas de concepção podem estar relacionadas a falhas do reconhecimento materno da gestação. O interferon-tau (IFNT) é liberado do trofotoderma do conceito entre os dias 8 e 25 da gestação e, ao atingir um limiar suficiente no dia 16, o reconhecimento materno é iniciado, incluindo a manutenção do corpo lúteo e o desenvolvimento de um ambiente receptivo no útero (LONERGAN & FORDE, 2014).

A ação do BVDV causa desregulação da resposta antiviral do interferon (IFN) e, consequentemente, interfere na sinalização do IFNT no endométrio e compromete a sinalização da gestação (WATHES et al., 2020). O BVDV pode interferir nas funções imunológicas do útero ao inibir expressão de genes tipicamente regulados positivamente no endométrio bovino, importantes nas respostas imunes inatas a vírus e bactérias, predispondo assim o útero à infecção bacteriana secundária e à endometrite, o que torna o ambiente uterino incompatível com o desenvolvimento embrionário (OGUEJIOFOR et al., 2015; CHENG et al., 2019). A diminuição na concentração de progesterona plasmática durante a fase lútea inicial em vacas infectadas também foi relatada, comprometendo a concepção (FRAY et al., 2002).

A infecção transplacentária do feto em desenvolvimento com BVDV até 150 dias de gestação pode resultar em morte embrionária, mumificação, aborto, infecção persistente, além do nascimento prematuro de um bezerro vivo, mas fraco ou subdimensionado ou aparentemente normal, e várias malformações congênitas (GROOMS, 2004). A morte do feto e o aborto subsequente estão relacionados ao efeito direto do vírus sobre o conceito e a placenta, tendo como resultado uma vasculite na porção materna, além de comprometer e favorecer a separação da unidade materno-fetal (OGUEJIOFOR et al., 2019).

Nos touros, tanto em infecções persistentes quanto em infecções agudas, o BVDV se estabelece em testículos e glândulas sexuais acessórias, principalmente em vesícula seminal e próstata, com alterações morfológicas importantes, caracterizadas por hipoplasia testicular, atrofia de túbulos seminíferos, por vezes acompanhada por ausência de espermatogênese (BOREL et al., 2007; READ et al., 2020). Eventualmente, os touros desenvolvem infecção persistente nos testículos,

principalmente dentro dos compartimentos imunoprivilegiados dos túbulos seminíferos, com detecção no sêmen por meses após uma infecção aguda inicial, porém, com risco de transmissão pouco provável após nove semanas (WATHES et al., 2020; READ et al., 2020). A qualidade seminal pode não apresentar anormalidades, no entanto a infecção aguda de touros sexualmente ativos resulta na redução da densidade e motilidade dos espermatozoides, além de um aumento nas anormalidades espermáticas (LANYON et al., 2014). O sêmen de touros infectados também pode constituir uma fonte potencial de infecção para vacas suscetíveis (OGUEJIOFOR et al., 2019). Além de promover a infecção, a utilização de sêmen de touros infectados, seja através da monta natural ou inseminação artificial, é capaz de reduzir a taxa de concepção das fêmeas (RIKULA et al., 2008), assim como o uso sêmen de touros PI interfere diretamente no sucesso de técnicas de fertilização *in vitro*, reduzindo a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário (ALTAMIRANDA et al., 2012).

1.7 MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS

A infecção pelo BVDV em vacas prenhes pode causar uma série de malformações congênitas nos fetos, especialmente quando ocorre entre 80 e 150 dias, que resultam da ausência de um sistema imunológico plenamente estabelecido e da combinação entre danos celulares e respostas inflamatórias ocasionadas pelo vírus (AGERHOLM et al., 2015). As anomalias congênitas mais comuns são as malformações em sistema nervoso central, principalmente quando os órgãos do sistema ainda encontram-se em processo de crescimento e diferenciação (GROOMS, 2004). A principal apresentação encefálica é a hipoplasia cerebelar, a qual apresenta intensidade variável e, por vezes, é caracterizada pela formação de pequenos nódulos de tecido cerebelar remanescente, nos quais a diferenciação regular em lobos ou folias é descaracterizada (GOLCHIN et al., 2023). Outras malformações associadas ao BVDV envolvem o cérebro, como a hidrocefalia, a porencefalia, a hidranencefalia e a microcefalia, que geralmente ocasionam uma série de sinais clínicos, como ataxia, tremores e falha no desenvolvimento dos bezerros afetados (AGERHOLM et al., 2015)

Malformações em outros órgãos e sistemas podem estar associadas às anomalias em sistema nervoso central ou ocorrerem de forma isolada (BLANCHARD et al., 2010). Entre as anormalidades musculoesqueléticas, destacam-se a artrogripose, o bragnatismo mandibular, o encurtamento dos membros e a hipoplasia muscular (GROOMS, 2004; BLANCHARD et al., 2010). Outras malformações congênitas que

foram associadas à infecção por BVDV incluem alterações oculares como microftalmia bilateral, catarata, displasia retiniana, neurite óptica e atrofia, além de anomalias pulmonares e tímicas, caracterizadas por hipoplasia, bem como displasia renal (GROOMS, 2004). Há relatos de alterações de pelagem como hipotricose, alopecia e pelos crespos (LARSSON et al., 1991). Bezerros nascidos fracos após infecção uterina apresentam alta mortalidade na primeira semana de vida, bem como baixo crescimento até o desmame, se comparados com bezerros saudáveis (FOUNTAIN et al., 2021).

1.8 INFECÇÃO PERSISTENTE

Fetos que sobrevivem à infecção por BVDV até 120 dias de gestação, consequentemente desenvolvem imunotolerância e tornam-se PI (LIEBLER-TENORIO, 2005). Para que haja persistência viral, a infecção deve ocorrer durante um período de desenvolvimento fetal em que o sistema imunológico está incompleto, com respostas imunes inatas e adaptativas evitadas, o que permitirá que as proteínas virais sejam reconhecidas como autoantígenos, que resultará em viremia constante e eliminação de grandes quantidades de vírus em todas as excreções e secreções, incluindo leite, sêmen, saliva, secreções nasais, urina, sangue e aerossóis (LANYON et al., 2014). A persistência está associada à infecção por cepas NCP, as quais possuem habilidade de inibir a indução de IFN-1, um importante mediador da imunidade inata em infecções fetais precoces (SCHWEITZER et al., 2006). Apesar da capacidade de atravessarem a placenta e alcançarem o feto, as cepas CP não foram associadas ao estabelecimento de infecções persistentes (BROWNLIE et al., 1989; CANAL et al., 1998).

A infecção aguda de matrizes prenhes suscetíveis é a origem mais frequente de animais PI, embora vacas PI origem somente descendentes PI (LANYON et al., 2014). Estes animais podem ser clinicamente saudáveis, mas geralmente apresentam subdesenvolvimento, fertilidade reduzida e imunossupressão constante, que resulta em morte devido a infecções secundárias em diversos sistemas durante o primeiro ano de vida ou ao desenvolvimento de doença das mucosas (HANSEN et al., 2010; BIANCHI et al., 2017). Os fetos PI apresentam peso ao nascer significativamente menor e comprimento crânio-coccígeo inferior quando comparados com fetos transitoriamente infectados ou saudáveis (HANSEN et al., 2010). Bezerros PI que eventualmente sobrevivam ao primeiro ano de vida apresentam desempenho prejudicado, com ganhos de peso vivo diário reduzidos até os 450 dias de idade (FOUNTAIN et al., 2021). As anormalidades no crescimento apresentadas por esses

animais podem estar relacionadas ao comprometimento da modelagem trabecular de ossos longos, resultado da diminuição de osteoclastos e baixa atividade de osteoblastos (WEBB et al., 2012).

1.9 DOENÇA DAS MUCOSAS

A doença das mucosas (DM) é uma síndrome clínico-patológica grave e fatal que acomete animais PI (HILBE et al., 2013). O desenvolvimento da enfermidade ocorre quando há infecção simultânea entre uma cepa CP do BVDV antigenicamente semelhante ou, mais frequentemente, por mutações na cepa NCP já circulante no animal PI (CHERNICK et al., 2018). O biótipo CP difere do NCP devido a sua capacidade de expressar a proteína NS3, uma forma clivada da proteína NS2-3 presentes no biótipo NCP, capaz de induzir morte celular e lesões epiteliais, principalmente pela ativação da via apoptótica intrínseca, com maior expressão de caspases específicas (HILBE et al., 2013).

Animais PI de todas as idades podem ser afetados pela doença, mas com maior frequência até um ano de idade (DARWEESH et al., 2015; CRUZ et al., 2018). As células epiteliais são alvos comuns, principalmente os queratinócitos do trato espinhoso, que se tornam necróticos e resultam em lesões erosivas e ulcerativas em pele, plano nasal, pré-estômagos, abomaso e intestinos (BIANCHI et al., 2017). As lesões extensas ao longo do trato gastrointestinal são as características mais marcantes do quadro e predispõem a diarreia e infecções bacterianas secundárias, induzindo um quadro de doença perceptível (CRUZ et al., 2018). Entre os achados clínicos típicos, destaca-se a anorexia e o emagrecimento progressivo, febre, secreção nasal e ocular, desidratação, claudicação e lesões cutâneas generalizadas (BIANCHI et al., 2017; CRUZ et al., 2018). A DM pode ocorrer sob a forma de surto e possui alta taxa de mortalidade, com progressão ao óbito dentro de poucas semanas após o início dos sinais clínicos (CRUZ et al., 2018).

1.10 SÍNDROME NEFRÓTICA

Nefropatias são raramente associadas ao BVDV, com descrições de glomerulopatias associadas à infecção persistente (TRANG et al., 2014; WHITE et al., 1986). A etiologia dessas lesões está ligada à persistência do vírus no hospedeiro, que, apesar de ser sorologicamente negativo e imunotolerante, pode favorecer a deposição de imunocomplexos nos glomérulos (HEWICKER et al., 1987). A patogenia da síndrome nefrótica fundamenta-se em mecanismos imunomediados, nos quais há

uma reação de hipersensibilidade do tipo III, onde o antígeno viral, o componente C3 do complemento e imunoglobulinas, especialmente a IgG, acumulam-se no espaço mesangial e em membrana basal dos glomérulos (TRANG et al., 2014).

Clinicamente, a síndrome nefrótica em bovinos caracteriza-se por edema generalizado, ascite e emagrecimento, muitas vezes acompanhados de diarreia persistente (WHITE et al., 1986). Os achados macroscópicos em nefropatias imunomediadas tendem a ser discretos, mas incluem rins levemente aumentados, por vezes pálidos, com cortical manifestando pontos avermelhados ou micro-nodulações conforme a cronicidade (NEWMAN, 2011). Microscopicamente, a lesão mais característica é a glomerulonefrite membranoproliferativa, definida por glomérulos hiper celulares e hipersegmentados devido à proliferação de células mesangiais e endoteliais, além do aumento da matriz mesangial (TRANG et al., 2014). Em casos avançados, observa-se também fibrose periglomerular, esclerose focal e nefrose tubular com presença de cilindros hialinos (NEWMAN, 2011).

A confirmação de síndrome nefrótica secundária à glomerulopatia imunomediada se baseia na evidenciação de depósitos de imunoglobulinas nas membranas basais dos glomérulos por meio de imunofluorescência, bem como na associação com o quadro clínico debilitante e às lesões anatomopatológicas renais (HEWICKER et al., 1987; TRANG et al., 2014).

1.11 EFEITOS NO SISTEMA RESPIRATÓRIO

O BVDV exerce importante papel no estabelecimento de doenças no trato respiratório de bovinos (GUO et al., 2021). A infecção pelo vírus pode ocasionar pneumonia leve e, esporadicamente, resultar em surtos, com manifestações clínicas de doença respiratória como febre, taquipneia e estertores pulmonares alterados (WALZ et al., 2020). Embora não seja o principal local de replicação, o BVDV pode estabelecer infecções no trato respiratório de bovinos e ocasionar lesões ao epitélio e depleção do tecido linfóide associado a brônquios e bronquíolos (BALT), com manifestações predominantemente subclínicas (LIEBLER-TENORIO et al., 2002). Apesar disso, as doenças respiratórias estão entre os principais desafios enfrentados por animais imunossuprimidos por BVDV, especialmente os PI, que frequentemente sucumbem à doença (RIDPATH, 2010).

O BVDV é um dos principais agentes associados à doença respiratória bovina (DRB), uma síndrome polimicrobiana caracterizada pela interação entre dois ou mais

microrganismos patogênicos, virais e/ou bacterianos (GUO et al., 2021). Entre os demais agentes mais comumente envolvidos, destacam-se: Herpesvirus bovino-1 (BoHV-1), Influenzavirus D (Flu D), Respirovirus bovino 3 (PI-3) e Orthopneumovirus bovino (BRSV) e Coronavírus bovino (BCoV); as bactérias comensais do trato respiratório pertencentes à família *Pasteurellaceae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*, além de *Mycoplasma* spp. (GAUDINO et al., 2022). A DRB comumente acomete animais jovens e sob a forma de surtos, principalmente quando são submetidos a condições ambientais altamente estressantes, como desmame, transporte e superlotação (SILVA SILVEIRA et al., 2020).

Apesar de não atuar diretamente como um patógeno respiratório primário, o BVDV contribui de diferentes maneiras para a ocorrência e aumento da gravidade da DRB (RIDPATH, 2010). Seu papel principal durante a DRB é imunossupressor, que cursa com supressão da quimiotaxia celular, produção de interferon e fagocitose, predispondo o estabelecimento de infecções secundárias por agentes oportunistas (AL-KUBATI et al., 2021). Efeitos sinérgicos entre BVDV e agentes secundários também ocorrem e resultam em patogênese aumentada e disseminação facilitada de patógenos pelos tecidos (RIDPATH, 2010). Apesar de agentes bacterianos estarem frequentemente envolvidos na DRB, coinfeções unicamente virais são comuns e normalmente associadas à prévia infecção por BVDV, que agrava a doença respiratória induzida por outros vírus de maneira semelhante às superinfecções bacterianas (GUADINO et al., 2022).

1.12 EPIDEMIOLOGIA

Estudos epidemiológicos acerca do BVDV foram desenvolvidos em todo o mundo e evidenciaram distribuição global do agente através da prevalência de antígenos e anticorpos na população bovina (SCHARNBOCK et al., 2018; ZIRRA-SHALLANGWA et al., 2022; SU et al., 2023). A detecção do antígeno demonstrou taxa global de infecção ativa de 15,74%, com os maiores índices de positividade observados na Europa (23,27%) e Ásia (16,75%). Com relação a detecção de anticorpos, 42,77% da população amostrada demonstrou contato prévio com BVDV, sendo a América do Sul a região com maior positividade (76,4%), seguida pela América do Norte (47,79%) (SU et al., 2023). A prevalência mundial de infecção persistente é estimada em 0,36% a nível animal e 18,88% a nível de rebanho, demonstrando acometimento principal de

animais com menos de 6 meses oriundos de rebanhos leiteiros não vacinados (SCHARNBOCK et al., 2018).

A distribuição mundial do BVDV-1 é significativamente mais ampla em relação ao BVDV-2. Uma ampla variedade de subgenótipos ocorre principalmente em países europeus e asiáticos, em contraste com menor diversidade observada nas Américas, Austrália e África. No continente americano, o BVDV-1 também é predominante em relação ao BVDV-2, especialmente o BVDV-1a e 1b, mas com baixa variabilidade entre os diversos subgenótipos (YESILBAG et al., 2017). No Brasil, as detecções de pestivírus ocorreram de forma distinta entre as diferentes regiões. Aproximadamente 54,4% dos isolados referem-se ao BVDV-1, envolvendo principalmente os subgenótipos 1a (32,9%) e 1b (21,8%). Já a detecção do BVDV-2 ocorreu em 25,7% dos casos, com predominância do subgenótipo 2b (85,2%), sendo a maioria dos isolados obtidos no Rio Grande do Sul (FLORES et al., 2018). O *P. brasiliense* tem sido frequentemente detectado em diferentes estados do país, com estudos recentes que apontam uma possível predominância no cenário nacional (MOSENA et al., 2022; BAUMBACH et al., 2023).

A prevalência do BVDV pode estar relacionada ao tamanho do rebanho. A continuidade do agente é favorecida em rebanhos maiores, principalmente, pela densidade animal, manejo inadequado e maior propensão à exposição de animais externos (ZIRRA-SHALLANGWA et al., 2022), enquanto rebanhos pequenos e de baixa densidade tendem a baixa ocorrência do vírus, sobretudo pela possibilidade de autodepuração (ALMEIDA et al., 2013). O tipo de exploração também interfere na soropositividade. Os níveis de soroprevalência apresentam-se mais elevados no gado leiteiro, possivelmente pelo longo período de serviço das vacas, frequente contato entre animais e ordenhadores, assim como maior possibilidade de infecção cruzada durante o manejo diário (SU et al., 2023). Rebanhos de corte apresentaram soroprevalência significativamente mais baixa, menor número de indivíduos PI e menos problemas relacionados ao BVDV se comparado a rebanhos mistos ou leiteiros, mesmo sem vacinação (SARRAZIN et al., 2013).

A transmissão vertical é a via mais importante e eficiente para a disseminação do BVDV, sendo responsável pela geração de animais PI, os quais eliminam o vírus continuamente ao longo de sua vida (LANYON et al., 2014). A taxa de disseminação do vírus depende, em grande parte, da oportunidade de contato entre os animais PI e outros bovinos suscetíveis, especialmente em rebanhos não vacinados (MCGOWAN

et al., 2020). A principal forma de introdução de um animal PI nos rebanhos se dá pela comercialização de bezerros infectados e, principalmente, matrizes gestantes de um produto PI, os quais induzem surtos de infecções agudas, principalmente em rebanhos sem imunidade previa (ALBRECHT et al., 2021). Independentemente do tamanho do rebanho, uma única introdução de animal PI pode ocasionar persistência viral em uma população por até três anos, com maior impacto na produtividade um ano após a introdução (DAMAN et al., 2015).

Além da transmissão vertical, a transmissão horizontal pode ocorrer por diversas situações. O contato direto focinho-focinho entre bovinos de propriedades vizinhas, assim como comercialização associada ao trânsito rotineiro de animais com status imunológico desconhecido, principalmente quando há o envolvimento de animais PI (QI et al., 2019). Apesar de animais TI serem potenciais fontes de infecção, estes apresentam um período relativamente curto de secreção viral, aliado à reduzida quantidade de partículas virais eliminadas, o que reduz significativamente a eficiência na transmissão do BVDV (GOTO et al., 2021). No entanto, grandes rebanhos podem ser uma exceção, pois a circulação prolongada do vírus entre sucessivos hospedeiros temporários pode compensar a ausência momentânea de fontes persistentes, até que ocorra eventual infecção de fêmeas prenhes e surgimento de um animal PI, crucial para a sobrevivência do vírus por longos períodos (SCHWEITZER et al., 2021).

Outras formas de disseminação incluem a contaminação de vacinas que possuam em sua formulação subprodutos biológicos, como soro fetal bovino, também por embriões e sêmen contaminados e indevidamente tratados, exame retal, bem como a utilização de instrumentos infectados (LANG-REE et al., 1994; VALLE et al., 1999; NISKANEN & LINDBERG, 2003). Fatores associados à biossegurança e higiene foram fatores de risco em sistemas de corte e produção leiteira, especialmente pela movimentação de pessoas e equipamentos entre diferentes fazendas e rebanhos, que constitui uma fonte potencial de introdução do vírus (ALMEIDA et al., 2013).

1.13 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do BVDV é essencial para o controle e erradicação do agente nos rebanhos, sendo possível por meio de diferentes técnicas laboratoriais (SCHWEITZER et al., 2021; WANG & PANG, 2024). Os métodos de diagnóstico têm evoluído consideravelmente ao longo dos anos, com uma ênfase crescente em testes mais sensíveis e específicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase com

Transcrição reversa (RT-PCR) e variações, assim como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), adequados para triagens em larga escala e programas de controle de rebanhos (WERNIKE & BEER, 2024). O isolamento viral ainda é uma técnica valiosa para pesquisa e confirmação de casos, enquanto os testes sorológicos são amplamente utilizados para vigilância, além da imuno-histoquímica para associações do vírus às lesões histológicas (WANG & PANG, 2024).

3.11.1 Isolamento Viral (IV)

O isolamento viral é considerado um método padrão ouro para o diagnóstico do BVDV, utilizado para identificação viral em animais vivos através de amostras de sangue total, além de órgãos linfoides como baço, timo, linfonodos, placas de Peyer de animais necropsiados e fetos abortados (SANTOS et al., 2011). Este processo envolve a inoculação das amostras biológicas de animais suspeitos em uma variedade de culturas celulares suscetíveis à infecção pelo vírus, sobretudo células de células MDBK, oriundas de rim bovino (WANG et al., 2023). A replicação viral é identificada através de efeito citopático, caracterizado por vacuolização citoplasmática e, por vezes, fusão celular (RANA et al., 2025b). Entretanto, a maioria quase absoluta das cepas isoladas a campo são do tipo não-citopática (NCP), as quais não induzem morte celular e precisam ser identificadas com o uso de técnicas específicas, como a imunofluorescência e RT-PCR (SPETTER et al., 2020).

Embora seja um método clássico de diagnóstico do BVDV, há desvantagens relacionadas à complexidade para realizá-lo, como tempo para que o resultado seja obtido, necessidade de amostras virais íntegras (WANG & PANG, 2024). O isolamento viral pode ter sua eficácia comprometida quando utilizado para diagnóstico do BVDV em bezerros sob efeito da imunidade materna, pois a ação de anticorpos colostrais pode reduzir os níveis de vírus, bem como em animais com infecção aguda e transitória, os quais apresentam baixa carga viral circulante (RIDPATH, 2010).

3.11.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O ELISA é um método de diagnóstico sorológico rápido e eficaz para a detecção de anticorpo (indireto) ou antígeno (direto) (LANYON et al., 2014). O ELISA indireto consiste em um teste simples e rápido, de excelente sensibilidade e especificidade, amplamente utilizado em programas de controle e erradicação em larga escala (SCHWEITZER et al., 2021), podendo ser aplicado na detecção de anticorpos contra proteínas virais específicas em amostras de soro e leite (WERNIKE & BEER et al.,

2022). Várias modalidades do teste foram recentemente desenvolvidas, direcionados à detecção de diferentes proteínas como E2, tE2, além de um ELISA recombinante para detecção de NS3 e um ELISA multiplex, desenvolvido para identificar anticorpos contra cinco diferentes patógenos virais (WANG & PANG, 2024). No entanto, esse teste apresenta algumas limitações, como a impossibilidade de detectar animais PI, os quais não produzem anticorpos específicos para o vírus, além da incapacidade de distinguir anticorpos do BVDV e o vírus da doença da fronteira (*Pestivirus ovis*) em rebanhos mistos de bovinos e ovinos (SCHWEITZER et al., 2021).

O ELISA direto também apresenta boa sensibilidade e especificidade na detecção do BVDV, com frequente utilização para identificação de animais PI (WERNIKE & BEER, 2024). As proteínas virais NS3 e E^{rns} são altamente conservadas entre as cepas do BVDV e utilizadas como antígenos alvo, o que possibilita a identificação, principalmente, em entalhes de orelha, por não sofrer interferência de anticorpos maternos (SCHWEITZER et al., 2021), mas também em soro sanguíneo e leite (DUBOVI, 2013). Apesar de ser altamente eficiente no diagnóstico, o ELISA direto possui limitações. A presença de anticorpos colostrais em bezerros muito jovens pode bloquear a detecção do antígeno e ocasionar um resultado falso-negativo, por esse motivo, teste de soro não é recomendado para bezerros com menos de 3 meses de idade (WERNIKE & BEER, 2024). Resultados de testes falso-negativos também podem ser obtidos usando amostras de soro com animais PI que foram repetidamente vacinados para BVDV, principalmente se utilizadas vacinas vivas modificadas (DUBOVI, 2013).

3.11.3 Imuno-Histoquímica (IHQ)

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica de detecção de antígeno em tecidos por uma reação química que resulta na coloração de um agente cromogênico com base na ligação de anticorpos a um antígeno específico (HARMS et al., 2023). Programas de controle do BVDV envolvem diretamente a identificação de animais PI nos rebanhos e podem contar com o auxílio da imuno-histoquímica (DUBOVI, 2013). Essa técnica possibilita um diagnóstico específico e sensível para *Pestivirus*, com a identificação do BVDV em infecções persistentes por meio amostras de pele e diversos outros órgãos fixados em formalina e incluídos em parafina, bem como em tecidos de fetos abortados e natimortos (SANTOS et al., 2011; BIANCHI et al., 2017). Nos casos de animais com infecção aguda e transitória, a marcação também ocorre, porém com

menor intensidade (CORNISH et al., 2005). A técnica de IHQ possui a vantagem de não ser afetada pela presença de anticorpos maternos, o que permite a utilização do teste em animais de qualquer idade (HILBE et al., 2007).

A IHQ é um teste laborioso e propenso a problemas operacionais, além de estar sujeito a análises subjetivas na determinação do resultado, o que requer maior experiência técnica (CORNISH et al., 2005). Além disso a técnica se limita a detecção da presença do antígeno, não sendo capaz de caracterizar genotipicamente a amostra viral presente nos tecidos, uma vez que amplificação e sequenciamento do material genético depende da associação de outras técnicas (SANTOS et al., 2011).

3.11.4 Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR)

A RT-PCR é um método superior de detecção, que oferece agilidade, maior especificidade e sensibilidade em comparação ao isolamento viral, além de poder determinar a sequência de ácido nucleico do BVDV em amostras nas quais o vírus foi inativado (WANG & FENG, 2024). Devido a sua alta eficiência, essa técnica se tornou o método diagnóstico rotineiro para BVDV (VILCEK et al., 1994a; CANAL et al., 1998), que pode ser aplicada sobre uma variedade de amostras biológicas, incluindo soro, sangue, leite, tecidos e órgãos (SPETTER et al., 2021), especialmente nos casos de aborto e natimortalidade (MARIAN et al., 2024; WERNIKE & BEER, 2024). Para fins de diagnóstico, a região 5'UTR é geralmente escolhida como alvo de PCR, pois é a região mais conservada entre os pestivírus, permitindo a detecção simultânea de vários genótipos (SCHWEITZER et al., 2021).

Por não ser afetada pela presença de anticorpos maternos, a RT-PCR é a técnica mais indicada para testagem de animais com idade inferior a 6 meses, garantindo a detecção de infecções persistentes, assim como infecções transitórias quando o animal foi amostrado durante a fase virêmica (HANON et al., 2014). O resultado positivo não define o estado clínico do animal, uma vez que a técnica permite a detecção do material genético do vírus em animais vacinados com vacinas vivas modificadas, agudamente infectados ou com infecção persistente, a qual somente pode ser determinada após a positividade em sucessivas análises, com intervalo mínimo de quatro semanas (DUBOVI, 2013). A RT-PCR permite, ainda, o agrupamento de amostras e realização do teste através de *pools*, com a diminuição dos custos para triagem de um rebanho (SCHWEITZER et al., 2021).

A maioria das técnicas moleculares disponíveis são capazes de identificar simultaneamente BVDV-1 e 2 (SCHWEITZER et al., 2021). Entretanto, ensaios de RT-PCR amplamente empregados na rotina diagnóstica, especialmente aqueles direcionados à região 5'UTR, podem apresentar falhas de amplificação decorrentes de incompatibilidades de sequência entre os primers e o genoma do *P. braziliense*, resultando em baixa sensibilidade ou mesmo ausência de detecção (MOORTHY et al., 2019). Diante disso, RT-PCR de alta sensibilidade, técnicas multiplex, bem como desenvolvimento de *primers* PanPestivirus, foram introduzidos com o objetivo de detectar simultaneamente BVDV-1, BVDV-2 e *P. braziliense* em uma única reação, permitindo a diferenciação de pestivírus em regiões onde múltiplas espécies virais circulam paralelamente (MARI et al., 2016; MONTEIRO et al., 2019).

3.11.5 Sequenciamento Genético e Filogenia

O sequenciamento genético, total ou parcial, tem se tornado uma ferramenta importante tanto no diagnóstico quanto na compreensão da epidemiologia do vírus (RIVAS et al., 2022). Caracterizar geneticamente os isolados do BVDV é fundamental para a identificação de variações biológicas relacionadas à patogenicidade e apresentação clínica, além de determinar a variabilidade antigênica entre genótipos e subgenótipos (ZHU et al., 2022). A associação com a análise filogenética possibilita estabelecer a ocorrência e distribuição de diferentes representantes do BVDV em determinadas regiões, além da identificação de variantes atípicas do vírus (MOSENA et al., 2022). A tipificação do vírus detectado possui implicações no controle do agente nos rebanhos, uma vez que a utilização de vacinas com determinados genótipos e subgenótipos pode conferir imunidade insuficiente a animais desafiados por cepas diferentes das vacinais (AL-KUBATI et al., 2021).

3.11.6 Outras Técnicas Moleculares

Diversas outras técnicas moleculares podem ser empregadas na detecção do BVDV. A PCR em tempo real é uma alternativa importante à PCR convencional, pois pode monitorar a produção de produtos de amplificação em tempo real por meio da detecção de um sinal fluorescente durante cada ciclo da reação, sendo SYBR Green I e a sonda TaqMan são os dois ensaios de PCR em tempo real mais comumente usados (WANG & FENG, 2024). O SYBR Green I mostra-se altamente sensível para detectar a infecção aguda, principalmente por BVDV-1, em sangue total de bovinos, com sensibilidade considerada dez vezes maior do que a da RT-PCR convencional (ZHANG

et al., 2011), além de maior taxa de detecção da infecção em amostras de aerossol (HOU et al., 2020). Já a PCR multiplex em tempo real com sondas TaqMan é altamente precisa e específica para detecção do BVDV-1 e BVDV-2, com aumento de 10.000 vezes na sensibilidade em relação à técnica convencional (WANG & FENG, 2024), sendo muito utilizada para o diagnóstico de múltiplos agentes envolvidos na doença respiratória bovina (ZHANG et al., 2022).

A hibridização *in situ* (HIS) é uma técnica passível de utilização para o diagnóstico do BVDV, sendo amplamente utilizada para detecção e localização de ácidos nucleicos em amostras biológicas (MONZEJI et al., 2016). A hibridização *in situ* é baseada na formação de pares de bases complementares entre sondas marcadas e o RNA viral alvo nas amostras de tecido fixadas (HEIDARE et al., 2021). As sondas de hibridização para BVDV são projetadas com sequências complementares ao RNA do vírus, geralmente focando em regiões conservadas do genoma, e podem ser marcadas com diferentes componentes que emitem fluorescência ou enzimas, possibilitando a visualização por microscopia de fluorescência ou microscopia óptica após reação de coloração (MONZEJI et al., 2016). Embora a PCR e o ELISA sejam amplamente utilizados para diagnóstico do BVDV, a utilização desses testes requer dispositivos especializados e onerosos que podem limitar sua aplicação rotineira, dessa forma a HIS oferece uma ferramenta complementar que se destaca pela sua capacidade de demonstrar o agente diretamente no tecido infectado, além de maior facilidade de aplicação (ASKARAVI et al., 2017)

3.12 CONTROLE E PREVENÇÃO

Os países europeus foram pioneiros no desenvolvimento de programas voltados ao controle e erradicação do BVDV. Até o final da década de 80, acreditava-se que controlar o vírus era inviável devido à sua ampla distribuição e à falta de testes diagnósticos eficazes e acessíveis, mas com o surgimento dos testes de ELISA o diagnóstico em larga escala foi possível (GOTTSCALK et al., 1992). O primeiro programa voluntário surgiu na Alemanha, ainda na década de 80, com foco na detecção e eliminação de animais PI e na vacinação gratuita de fazendas livres do vírus (MOENNIG & YARNALL, 2021).

Estratégias de controle do BVDV têm se mostrado eficazes quando há atenção à epidemiologia do vírus, com enfoque principal na detecção e descarte de animais PI, estabelecimento da vacinação em rebanhos livres e biosseguridade (EVANS et al.,

2019). Diversos países ao redor do planeta estabeleceram programas de controle e erradicação do BVDV, voluntários ou obrigatórios, com a utilização de técnicas moleculares e sorológicas para detecção da circulação viral nos rebanhos (SCHWEITZER et al., 2021; ALBRECHT et al., 2021; TOPLAK et al., 2021). Em países com alta soroprevalência e/ou vacinação disseminada, a detecção direta do vírus foi o método de escolha em vez da vigilância sorológica (MOENNIG & YARNALL, 2021). Na Suíça, um dos países europeus com maior prevalência do BVDV, a testagem em massa da população e, posteriormente de todos recém-nascidos, permitiu a detecção viral e eliminação de positivos, culminando na erradicação do BVDV no país. Posteriormente, uma vigilância sorológica foi estabelecida para manutenção do status e detecção precoce de possíveis ressurgências do vírus, a partir da análise de amostras de leite ou soro (SCHWEITZER et al., 2021).

Apesar da diversidade de estratégias adotadas em esquemas de controle e erradicação do BVDV, alguns componentes são fundamentais para que resultados eficazes sejam alcançados: a identificação de rebanhos infectados, associada à detecção e remoção de animais PI; controle e restrição da movimentação de gado com status desconhecido para evitar a disseminação do agente, principalmente pelo comércio regional; adoção de medidas de biossegurança, como o estabelecimento de regras de quarentena para animais recebidos, controle na circulação de funcionários e pessoas externas ao rebanho, bem como adoção de critérios de higiene e limpeza das instalações e equipamentos contactantes aos animais; classificação de animais e rebanhos de acordo com seu status BVDV (MOENNIG & YARNALL, 2021).

A vacinação é uma importante ferramenta de controle adicional, principalmente quando destinada à imunização de fêmeas bovinas para prevenir uma nova geração de bezerros PI (MOENNIG & YARNALL, 2021). As vacinas são indicadas em situações que há grande rotatividade animal, presença de animais soropositivos, além de histórico de doença clínica e/ou reprodutiva com a confirmação do envolvimento do BVDV (RIDPATH, 2010). Atualmente, existem vacinas vivas modificadas e vacinas inativadas contra BVDV, as quais possuem cepas do tipo 1 e 2, com escassa variedade de subgenótipos, além da ausência de cepas de *P. braziliense* (HoBi-like) (EVANS et al., 2019; BAUMBACH et al., 2023).

No Brasil, a maioria das vacinas contra o BVDV disponíveis no mercado são inativadas e polivalentes, porém, recentemente duas vacinas vivas atenuadas foram disponibilizadas, as quais possuem cepas do BVDV-1 e BVDV-2 em suas formulações,

todas importadas, geralmente produzidas a partir de cepas americanas e alemãs (SILVA et al., 2021). Estudos demonstraram variações biológicas de rebanhos brasileiros em resposta à vacinação, como grande circulação viral e presença de animais TI, grande variação de títulos na avaliação sorológica em rebanhos vacinados (FRITZEN et al., 2024). A falta de vacinas produzidas a partir de cepas presentes na região onde se encontra a população a ser imunizada é problemática, pois a ocorrência de diferentes espécies, subgenótipos e variantes antigênicas em circulação tende a resultar por falhas vacinais (FLORES et al., 2000). Dessa forma, as vacinas devem conter em sua composição espécies e subtipos presentes no território em que será aplicada (RIDPATH, 2010).

CAPÍTULO II

1. ARTIGO 1: OUTBREAK OF BVDV-1b ASSOCIATED WITH PERSISTENT INFECTION, REPRODUCTIVE LOSSES, AND CONGENITAL MALFORMATIONS IN BEEF CATTLE IN SOUTHERN BRAZIL



Outbreak of BVDV-1b associated with persistent infection, reproductive losses, and congenital malformations in beef cattle in Southern Brazil

Lucas Marian¹ · Jéssica A. Withoeft¹ · Eduarda V. Rocha¹ · Giulia Bonatto¹ · Letícia F. Baumbach² · Carla R. Rodenbusch³ · Cláudio W. Canal² · Renata A. Casagrande¹

Received: 24 June 2025 / Accepted: 20 November 2025
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2025

Abstract

An outbreak of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in a herd of 218 beef cattle resulted in 15 late-term abortions and the birth of two weak calves. Neonate 1, at 28 days of age, exhibited ataxia and paresis, while Neonate 2, at one day of age, was underdeveloped. Neonate 1 presented with cerebellar hypoplasia, hydrocephalus, and porencephalic cysts. Histological examination revealed foliar dysgenesis and ectopic Purkinje neurons. Neonate 2, weighing 7 kg at birth, showed no histologic lesions. A single fetus at six months was necropsied and showed no gross lesions. However, histopathology revealed multifocal lymphoplasmacytic inflammation. Tissue samples from the neonates and fetus were tested for BVDV by RT-PCR, yielding negative results. Brain tissue was tested by RT-PCR for Simbu serogroup viruses and by PCR for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, all of which returned negative results. The entire herd was subjected to serum sampling for BVDV testing by RT-PCR. Six calves tested positive in all three consecutive rounds of testing, while one calf tested positive only once. Sera from the seven RT-PCR positive calves were subsequently tested by ELISA for antigen detection, with six testing positive. They were also tested by ELISA for antibody detection, with two calves showing seropositivity. Amplification products from three samples were submitted for Sanger sequencing and phylogenetic analysis, which identified BVDV-1b with 100% homology among the three sequences and a high similarity to Chinese strains. This study reports an outbreak of persistent infection by BVDV-1b in southern Brazil, with associated congenital malformations and reproductive losses.

Keywords Teratogenesis · Reproductive failure · Pestivirus · Pathology

Introduction

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is recognized as one of the major threats to cattle health and productivity worldwide, causing significant economic losses to the livestock industry [32]. The virus belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Pestivirus*, with two primary species that have been taxonomically reclassified as *Pestivirus bovis* (BVDV-1) and *Pestivirus tauri* (BVDV-2), each encompassing several characterized subgenotypes [29].

The primary mechanism of BVDV persistence is its ability to produce persistently infected (PI) individuals, which exhibit continuous viremia and shed large quantities of viral particles through their excretions. These animals represent the primary source of transmission within

✉ Renata A. Casagrande
renata.casagrande@udesc.br

¹ Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Santa Catarina 88520-000, Brazil

² Laboratório de Virologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 91540-000, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul 92990-000, Rio Grande do Sul, Brazil

herds [27]. In addition to persistent infection, BVDV is associated with a range of reproductive complications, including conception failure and abortions at any stage of pregnancy [22], as well as congenital malformations, such as musculoskeletal deformities and central nervous system abnormalities [15].

Outbreaks of Bovine Viral Diarrhea (BVD), resulting in multiple PI animals, have been reported in Brazil, particularly in open herds with frequent animal movement [4, 13, 21]. In Santa Catarina state, BVDV detection and molecular characterization have been limited, with scarce information regarding its impact on the cattle population [22, 26]. Therefore, the aim of this study is to describe an outbreak caused by BVDV-1b in a beef cattle herd in the Santa Catarina state, Southern Brazil, characterized by the occurrence of persistently infected calves, congenital malformations, and reproductive failures.

Materials and methods

In the spring of 2022, a beef cattle herd located in the mountainous region of Santa Catarina experienced a significant increase in reproductive disorders. The farm covered an area of 240 hectares, where cattle from different origins were progressively introduced over the course of one year. The breeding herd primarily consisted of Bradford cattle, including approximately 170 cows, the oldest of which was four years old, two bulls purchased from other local farmers at different times, eight one-year-old bulls, and 38 calves, all born on the property. The animals were managed under a semi-extensive system, grazing on native pastures during the summer and cultivated ryegrass and oats during the winter. Regarding reproductive management, fixed-time artificial insemination (FTAI) was employed, with bulls used exclusively for natural mating. The herd had not been vaccinated against reproductive diseases.

Two neonatal bovines and one fetus underwent necropsy. Tissue samples from all organs were collected in 10% buffered formalin, embedded in paraffin blocks, processed routinely, and stained with hematoxylin and eosin (HE) for optical microscopy examination. Brain, spleen, and thymus samples were also collected and stored at -80°C for further testing.

All animals in the herd underwent three blood collections at an average interval of 50 days. Approximately 10 mL of blood was obtained by venipuncture of the jugular and/or coccygeal veins. The samples collected during each session were centrifuged to separate the serum, which was then transferred to 2 mL microtubes and stored at -80°C for subsequent RT-PCR analysis.

Serum samples from the entire herd, as well as frozen spleen, thymus, and brain samples from the fetus and the two necropsied calves, were submitted to RT-PCR for the detection of BVDV using primers 324F and 326R, which target the 5'UTR region of the pestivirus genome [38]. Brain samples from Neonates 1 and 2 were also subjected to RT-PCR for the detection of viruses from the Simbu serogroup, which includes Schmallenberg virus (SBV), Shamonda virus, Akabane virus, and Aino virus, using primers panOBV-L-2959F and panOBV-L-3274R [12]. Brain samples from both the neonate calves and the aborted fetus were also tested by PCR for *Neospora caninum* using the primer pair Np21/Np6, which targets the Nc5 region [8]. Additionally, PCR for *Toxoplasma gondii* was performed on brain tissues using the primers SAG2.F4/SAG2.R4, which separately amplify the 5' and 3' ends of the SAG2 locus [40].

The BVDV amplification products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®) and sequenced via the Sanger method (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer, ThermoFisher Scientific®). The partial sequences of approximately 288 bp obtained were edited and concatenated using BioEdit™ 7.2 software, followed by genotype confirmation through analysis with the *GenBank* nucleotide *BLAST* tool. For phylogenetic analysis, representative sequences from pestivirus strains from various national and international pestivirus genotypes and subgenotypes deposited in *GenBank*, along with BVDV sequences from the present study were aligned using CLUSTAL W™. The phylogenetic tree was constructed using MEGA11 software. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method with bootstrap analysis of 500 repetitions, and evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter model.

Serum samples from the final blood collection of all animals that tested positive for BVDV by RT-PCR were tested for antigen and antibody using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), with the IDEXX BVDV Ag/Serum Plus and IDEXX BVDV Total Ab kits, respectively, based on the methodology described in the Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, as implemented by the World Organization for Animal Health (WOAH) [42]. For the interpretation of antigen ELISA results, samples with values ≤ 0.3 were considered negative, and those with values >0.3 were considered positive. For the antibody ELISA, samples with values ≤ 0.2 were considered negative, those with values >0.2 and < 0.3 were classified as suspect, and samples with values ≥ 0.3 were considered positive. Neonate 1 and 2 were not subjected to this assay due to the unavailability of serum.

Results

Over a 60-day period, 15 cows aborted, 12 of which were heifers, with most abortions occurring during late gestation. A female Braford fetus, with a crown–rump length of 55 cm, consistent with six months of gestation, showed atelectatic lungs and a moderate amount of serosanguineous fluid in the abdominal cavity, and was in a moderate stage of autolysis. Two neonatal calves that underwent necropsy exhibited developmental abnormalities.

Neonate 1, a female Braford, 28 days old, displayed neurological signs from birth, including ataxia, an inability to stand, paresis in the forelimbs, and spasticity in the hind limbs. The post-mortem examination revealed significant encephalic developmental impairment, particularly in the cerebellum. The cerebellum showed small protrusions without regular differentiation into lobes or folia, indicating severe cerebellar hypoplasia (Fig. 1A). The total weight

of the cerebellum was 1.6 g, representing 1.1% of the total brain mass (137.9 g). Additionally, hydrocephalus was observed, with dilation of the lateral ventricles, along with moderate multifocal porencephalic cysts (Fig. 1B–C).

Neonate 2 (Fig. 1D), also a female Braford, one day old, was born at full term, corresponding to the ninth month of gestation according to the owner's records from the fixed-time artificial insemination (IATF). However, the post-mortem examination revealed that the calf's cranio-coccygeal length was 52 cm, typical of a six-month gestational period, and it weighed only 7 kg. The calf remained in a recumbent position after birth and ingested colostrum with assistance. The calf died approximately 12 h after birth. Aside from the notable underdevelopment, no other macroscopic alterations were observed.

The fetus presented histological lesions characterized by mild to moderate multifocal lymphoplasmacytic epicarditis, myocarditis, and myositis. Additionally, there was mild

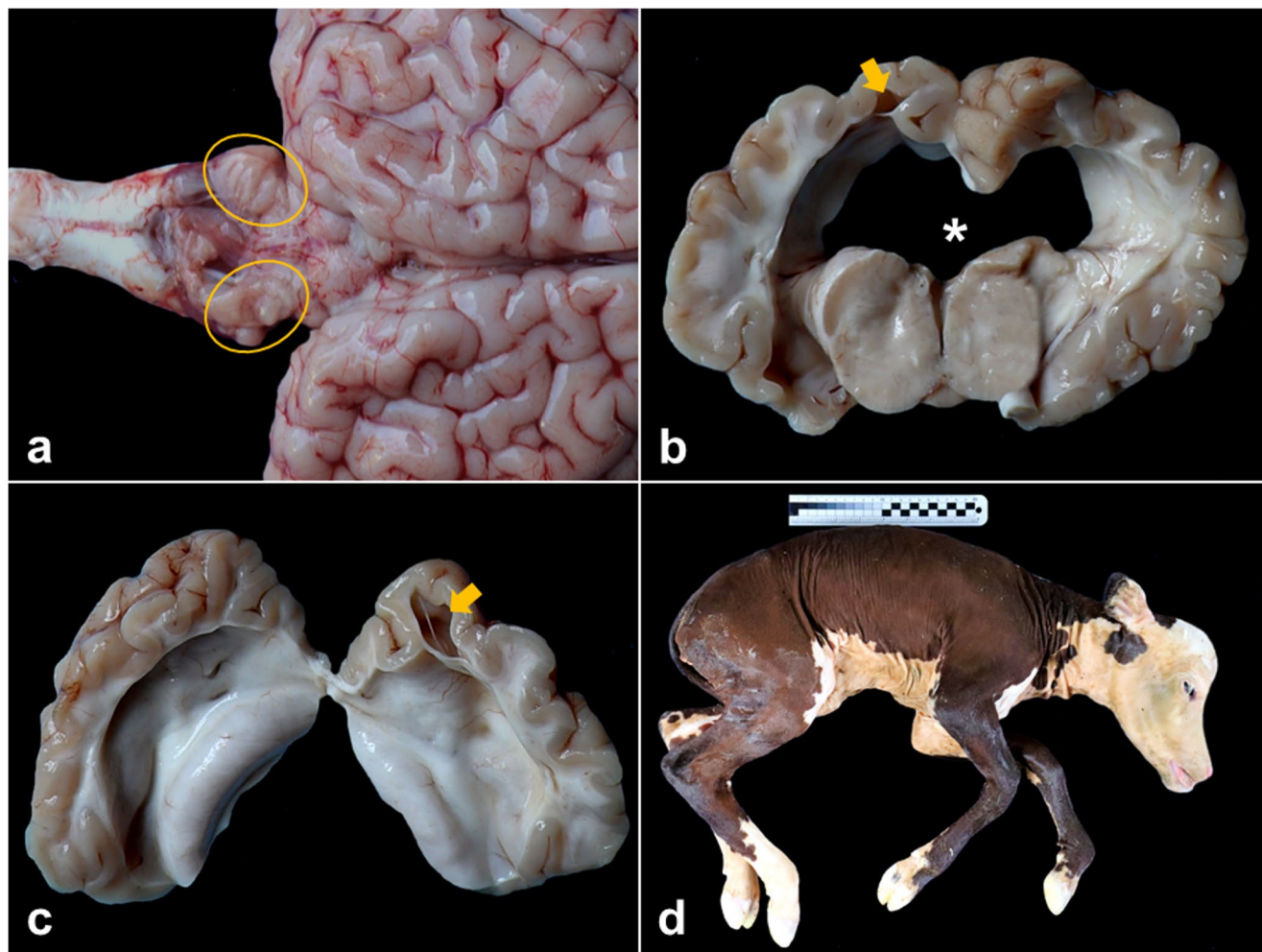


Fig. 1 Developmental abnormalities in calves from a beef cattle herd affected by a BVDV-1b outbreak in Southern Brazil. Neonate 1: **A** – brain: small vestigial cerebellar protrusions (highlights). **B** – parietal cortex in cross-section: pronounced hydrocephalus characterized by

dilation of the lateral ventricles (asterisk), as well as discrete multifocal porencephalic cysts in the parietal cortex (arrow); **C** – moderate focal porencephalic cyst in the occipital cortex (arrow). Neonate 2: **D** – severe underdevelopment (ruler: 20 cm)

multifocal interlobular mononuclear pneumonia, accompanied by meconium and keratin squames within the alveolar lumen, as well as moderate multifocal mononuclear serositis in the forestomachs and intestines and lymphoplasma-cytic interstitial nephritis.

The primary histopathological findings in Neonate 1 were in the cerebellum, where there was a loss of the usual architecture, marked diffuse hypoplasia, and foliar dysgenesis, with the cerebellum being replaced by massive white matter (Fig. 2A). Additionally, there was a reduction in the cortical portion and mild multifocal edema in the white matter. Segmental hypoplasia was also observed in the molecular, Purkinje, and granular layers, with ectopic Purkinje neurons scattered throughout the granular layer (Fig. 2B) and occasionally in the molecular layer.

BVDV was detected by RT-PCR in six clinically healthy calves, whose body development was appropriate for their age, during the three blood collections conducted throughout the study. A one-year old bovine tested positive by RT-PCR in the first of three blood tests, and negative in the subsequent two. Among the seven animals that tested positive for BVDV by RT-PCR, six were also positive for the virus in the antigen ELISA test; In the antibody ELISA, five calves did not show antibodies against the virus, while two had specific antibodies (Table 1).

The molecular analyses performed on the tissues of the neonatal calves and the fetus, along with their respective results, are presented in Table 2.

Among the six persistently infected (PI) calves with BVDV, three had amplified products that were subjected to genetic sequencing. The sequence analysis revealed that the three sequences, identified as UDESC/06/2025 (PQ014738.3), UDESC/07/2025 (PQ014739.3), and UDESC/08/2025 (PQ014740.2) shared 100% homology with one another. When compared with GenBank sequences, the maximum similarity observed was 98.91% with three BVDV-1b strains of Chinese origin: BJ-2016 (MH490943.1), HJ-1 (JX065783.1), and XZ5-8 (KP749795.1). Similarity percentages ranging from 96.77% to 98.7% were observed with BVDV-1b isolates detected in southern Brazil, including strains SV847/14 (MN022923.1), SV81712-15.5 (MN022916.1), and SV815/12-55.5.5 (MN022919.1) isolated in Rio Grande do Sul state; BRA/PR-2361/2019 (MT036102.1) from Paraná state; and the strain LV/LF66/12 (KP715122) identified in Santa Catarina state.

The phylogenetic tree generated using sequences from reference strains of different pestivirus species and subgenotypes, as well as closely related BVDV sequences from this study, grouped the sequences into three distinct branches (Fig. 3). One branch corresponded to *Pestivirus bovis* (BVDV-1), where the sequences from the calves in

Fig. 2 Histological lesions in the cerebellum of a neonate calf from a beef cattle herd affected by a BVDV-1b outbreak in Southern Brazil. (A) Dysgenesis of the cerebellar folia (arrows), associated with replacement by solid white matter (asterisks). (B) Segmental hypoplasia of the Molecular (M), Purkinje (P), and Granular (G) layers, along with ectopic Purkinje neurons with irregular distribution in the granular layer

this study clustered with subgenotype 1b sequences. The other branches corresponded to *Pestivirus tauri* (BVDV-2) and *Pestivirus giraffae* (GPv).

Discussion

Outbreaks involving BVDV have been reported globally [20, 27]. In the United States, a BVDV-1b outbreak resulted in congenital deformities, late-term abortions, and the birth of debilitated calves [5]. In Spain, the use of vaccines contaminated with BVDV-2b led to abortions and encephalic malformations in sheep [2]. While no reports of BVDV-related congenital malformations exist in Brazil, outbreaks of mucosal disease have been documented in cattle herds in Rio Grande do Sul state involving BVDV-1d [4] and in confined cattle in Paraná state associated with BVDV-1b [21]. BVDV-1b and 1d outbreaks in Paraná state have also been linked to neonatal diarrhea in a dairy herd [9] and persistent infection in dairy heifers, with enteric and respiratory consequences [13]. In Santa Catarina state, despite its proximity to states with multiple BVDV outbreaks, there has been only one reported case involving abortions caused by BVDV-2b and 1e [22]. No studies involving the participation of BVDV-1b in cases of persistent infection, congenital malformations, and reproductive failures were found in searches conducted on Google Scholar, PubMed, and Web of Science, suggesting that these conditions have not yet been previously described in cattle from the Santa Catarina state.

The origin of BVDV in this herd remains uncertain. Cattle from neighboring farms can be the source [31] and should be considered, as cattle farming was present in the vicinity of this herd. However, the repeated introduction of breeding cattle onto the farm appears to be the most likely source of the virus, since in beef herds, frequent commercial movement increases the likelihood of exposure to BVDV [14]. It is plausible that among the pregnant females acquired, at least one was TI or carrying a PI fetus, which, after birth, would have mingled directly with susceptible dams until weaning, thereby facilitating effective BVDV transmission [31]. Most of the cattle incorporated into the herd were pregnant heifers, a category already associated with a higher risk of viral introduction due to their increased chances of being PI or TI [14].

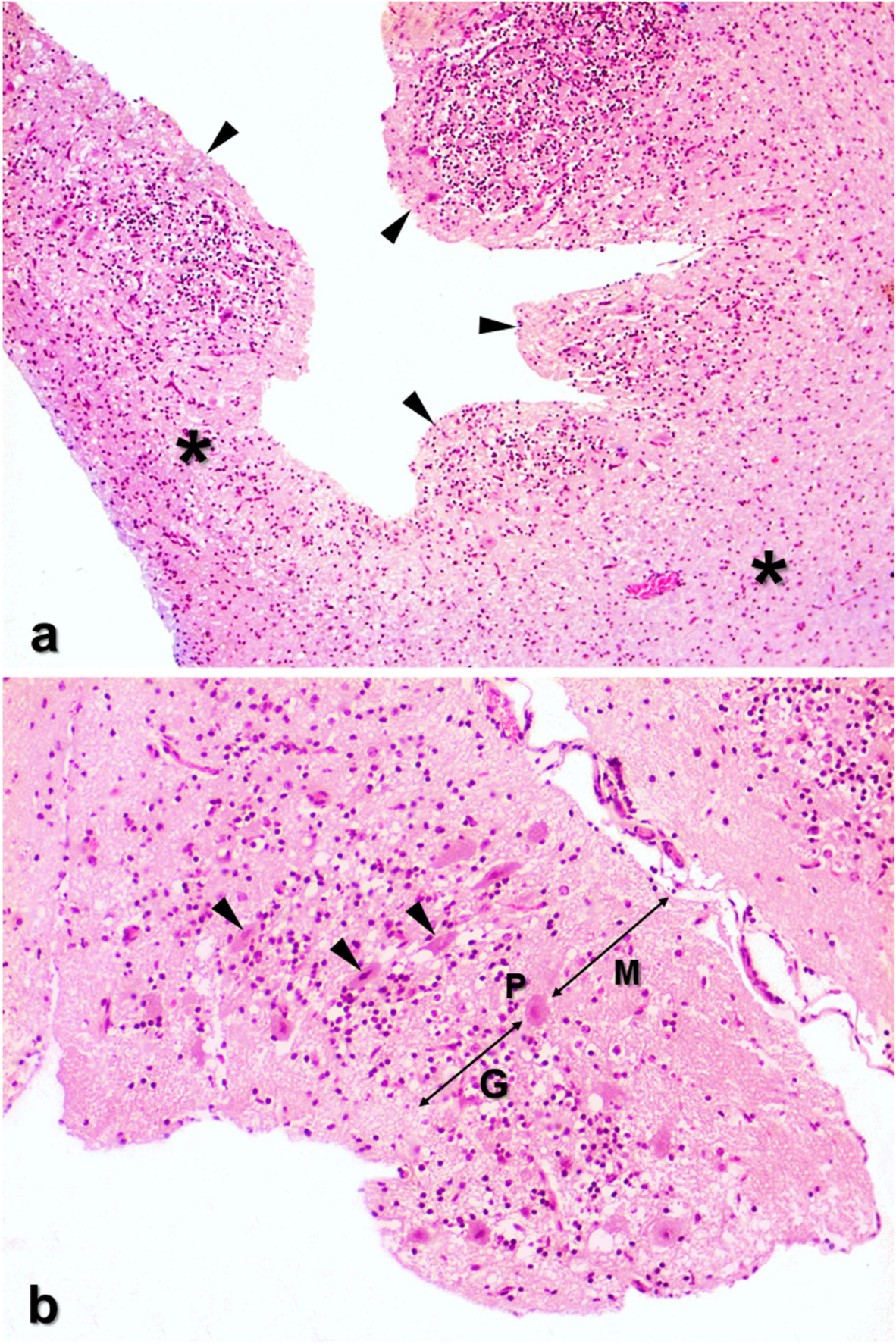


Table 1 Outbreak of persistent Infection, Abortions, and congenital malformations associated with BVDV-1b in beef cattle from Santa Catarina state, Southern Brazil

Bovine	Gender	Sample collection (age in days)	Days after first collection	RT-PCR BVDV	Antigen ELISA BVDV	Antibody ELISA BVDV
162	Female	1st (60)	0	+	+	-
		2nd (105)	45	+	(2,79)	(0,03)
		3rd (148)	88	+		
168	Female	1st (55)	0	+	+	-
		2nd (100)	45	+	(2,79)	(0,02)
		3rd (143)	88	+		
170	Male	1st (40)	0	+	+	-
		2nd (85)	45	+	(2,73)	(0,03)
		3rd (-)	*	*		
173	Female	1st (27)	0	+	+	+
		2nd (72)	45	+	(2,73)	(0,43)
		3rd (115)	88	+		
174	Female	1st (43)	0	+	+	-
		2nd (90)	47	+	(2,78)	(0,19)
		3rd (135)	92	+		
193	Male	1st (62)	0	+	+	-
		2nd (107)	45	+	(2,73)	(0,20)
		3rd (150)	88	+		
201	Male	1st (388)	0	+	-	+
		2nd (433)	45	-	(0,06)	(3,07)
		3rd (476)	88	-		

*Death before collection

Antigen ELISA: negative ≤ 0.3 and positive > 0.3

Antibody ELISA: negative ≤ 0.2 ; suspect > 0.2 and < 0.3 ; positive ≥ 0.3

Table 2 Outbreak of BVDV-1b infection in beef cattle from Santa Catarina State, Southern Brazil. Molecular analyses targeting the investigation of agents potentially responsible for abortion and malformations in cattle

Animal	Analyzed Organ(s)	Test	Pathogens	Result
Fetus	Spleen and Thymus	RT-PCR	BVDV	Negative
	Brain	PCR	<i>N. caninum</i> <i>T.gondii</i>	Negative
Neonate 1	Spleen, Thymus, Brain	RT-PCR	BVDV	Negative
	Brain	RT-PCR	Simbu serogroup	Negative
		PCR	<i>N. caninum</i> <i>T.gondii</i>	Negative
Neonate 2	Spleen, Thymus, Brain	RT-PCR	BVDV	Negative
	Brain	RT-PCR	Simbu serogroup	Negative
		PCR	<i>N. caninum</i> <i>T.gondii</i>	Negative

The approximately one-year interval between the arrival of the first cattle on the farm and the onset of production losses is consistent with the dynamics of BVDV. One study found that the annual prevalence of PI animals and immune dams carrying a PI fetus peaked in the year following virus introduction, with the greatest impact of BVDV dissemination on herd productivity, such as reproductive failures and PI mortality, occurring during the second year [10].

The impact of the virus could have been mitigated by vaccination, which, although not fully protective against all viral variants, is recommended in scenarios involving high animal turnover and frequent introduction of cattle with unknown immunological status [25, 30].

The detection of BVDV in six clinically healthy calves across three different analyses indicates persistent infection, highlighting that PI animals can exhibit normal growth without obvious clinical signs or physical debilitation [17]. To confirm persistent infection, the WOAHH recommends retesting initially positive animals after a minimum interval of three weeks, during which time the virus should still be detectable [42]. In addition to continuous viral detection, the absence of seroconversion over time further supports the diagnosis of persistent infection in five of the six calves, as acute infections typically prompt antibody production against BVDV around 14 days post-infection [7]. The 2.3% PI infection rate observed in this herd is higher than the global average of 0.36% [35], but comparable to other Brazilian reports, such as the 2.7% PI rate found in a mucosal disease outbreak in Rio Grande do Sul state [5] and the 0.43% rate in a dairy herd in Paraná state with reproductive disorders [28].

The detection of BVDV-specific antibodies in the final analysis of Calf 173 raised questions regarding their infection status, given that persistently infected (PI) animals are typically continuously viremic and remain seronegative,

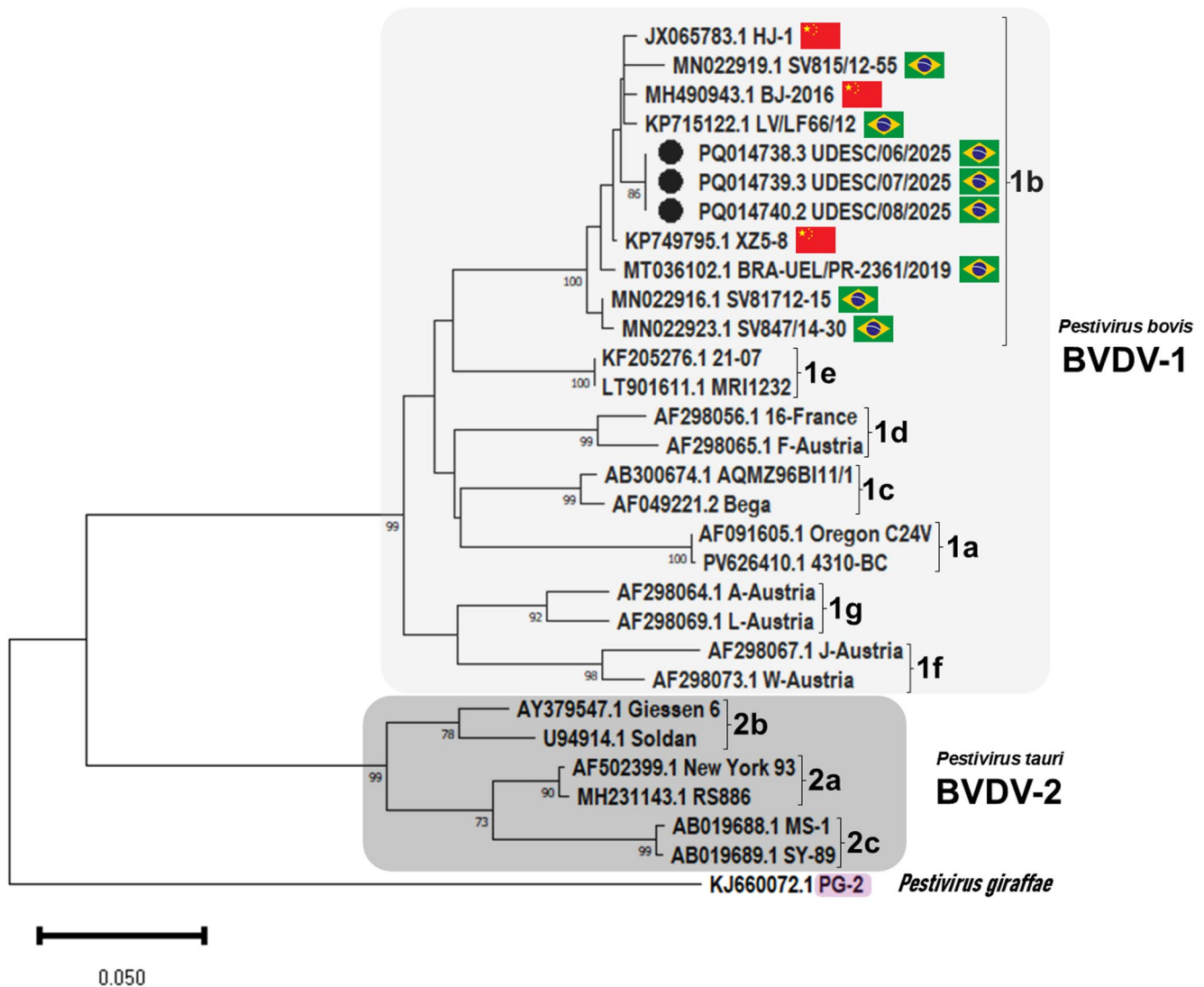


Fig. 3 Phylogenetic tree constructed from the 5'UTR region of the viral genome of *Pestivirus*, using sequences from persistently infected (PI) calves, as well as from reference strains, both Brazilian and international, of *Pestivirus bovis*, *P. tauri*, and *P. giraffae*, analyzed by the

Maximum Likelihood method with bootstrap analysis of 500 repetitions and the Kimura 2-parameter model. The strains isolated in this study are highlighted in the tree with a distinctive symbol (●)

whereas transiently infected (TI) animals develop long-lasting neutralizing antibodies approximately 14 days after infection [7]. Nevertheless, the possibility of persistent infection cannot be excluded. The antibodies detected may be of maternal origin, which can persist in circulation up to nine months of age [34] or may result from infection with a heterologous BVDV strain distinct from the one responsible for persistence which often induces a weak immune response, as observed in this animal [6, 33]. Chronic infection should also be considered, particularly due to the possibility of BVDV persistence in peripheral blood mononuclear cells for up to 100 days post-infection, even after seroconversion [7]. Similar cases have been reported in Spain and Japan, where repeated viral detection occurred for more than three weeks prior to seroconversion [16, 27].

In Neonate 1, the severity of cerebellar hypoplasia was evident through the significant reduction in cerebellar size (1.6 g/1.1%), while in adult cattle, the cerebellum typically represents approximately 10% of the total brain mass [3]. Microscopically, the cerebellum exhibited rudimentary protrusions with characteristic BVDV-related alterations, including foliar distortion, neuronal ectopia, and varying degrees of Purkinje cell necrosis [15]. Cerebellar hypoplasia was the primary teratogenic effect associated with BVDV in studies of neonatal calves exhibiting neurological signs [15, 19]. This malformation results from viral damage to granular cells, disrupting proper cellular migration and growth [23].

Cerebellar hypoplasia associated with BVDV infection is often accompanied by additional brain malformations

caused by the destruction of immature neuronal and glial cells, as well as direct damage to the neuropil [1, 23]. Hydrocephalus and porencephaly observed in Neonate 1 are recognized manifestations of congenital BVDV infection, although they occur less frequently than hydranencephaly [15, 19]. In cases of hydranencephaly, the cerebral hemispheres are replaced by large, sac-like cavities filled with fluid and lined by thin, partially translucent leptomeninges [15], a condition that was not identified in this animal. These malformations may be accompanied by histological lesions such as gliosis, astrocytosis, and lymphoplasmacytic infiltration [15, 19], none of which were observed in this case.

Some viruses classically associated with congenital malformations in ruminants, such as Akabane, Aino, Shamonda, and Schmallenberg, are endemic mainly in Europe, Asia, and Oceania [1, 37], but have never been detected in Brazil to date, making their involvement in this case unlikely. Thus, despite the negative RT-PCR result for BVDV, the exclusion of other potentially teratogenic agents and the confirmed circulation of the virus within the herd support the hypothesis of its association with the observed lesions, especially considering that BVDV is one of the main agents involved in encephalic malformations in cattle [15].

Abortions, congenital malformations, and the birth of weak calves followed by perinatal death, as observed in this study, are classical manifestations of BVDV infection, although the virus is not always detected [43]. The absence of viral detection has previously been reported in sheep, where intrauterine inoculation with BVDV resulted in the birth of lambs with congenital malformations and impaired development [11]. Similar reports describe calves with central nervous system malformations that tested negative for BVDV by RT-PCR, despite the confirmation of viral involvement through other diagnostic methods [5]. In the aborted fetus examined in this study, the anatomopathological findings were consistent with BVDV infection, especially after ruling out other agents capable of causing similar lesions [22, 35]. It is also important to consider that fetal autolysis and the instability of the virus under certain storage conditions may have contributed to the lack of viral detection [35].

The 100% homology between the three sequences indicates the involvement of a single viral strain, typical of outbreaks, suggesting a single point of origin for the infection [16, 27]. The high genetic similarity with Chinese strains suggests a common ancestral origin, indicating a possible introduction from other continents, such as Asia, from where there was an intense importation of zebu cattle until the mid-1960s [24, 26, 39]. This period coincides with the estimated time of emergence of the most recent common

ancestor and the onset of BVDV-1b diversification in Brazil, dated to around 1950, suggesting a potential route of introduction of the strain into the country [26].

It is important to note that the introduction of BVDV-1 subgenotypes into China occurred around the same time as in Brazil and coincided with the large-scale importation of live cattle [41]. This suggests that both countries may have acquired the subgenotype from a common source during intercontinental cattle movements [39]. In this regard, further studies utilizing temporal dispersion analysis and molecular clock models are essential to more accurately clarify the evolutionary and geographic pathways of BVDV-1b across continents [26, 36, 39].

Some limitations should be considered in this study. Although there is strong evidence supporting the association between BVDV and the abortions and malformation cases reported, some commonly used techniques for BVDV detection could not be applied, such as immunohistochemistry, due to the difficulty in obtaining specific antibodies in Brazil, and *in situ* hybridization, which remains difficult to access in the country [4, 18].

Although there are still gaps in understanding this BVDV outbreak, the gross and virological findings of this study indicate an increasing detection of different viral subgenotypes in recent years in the Santa Catarina state, with distinct clinical and pathological manifestations not previously reported in the region [22]. These findings suggest that BVDV may be endemic in this region, as well as in other southern Brazilian states, with the potential for greater genetic variability beyond the previously detected subgenotypes 1b, 1e, and 2b [26]. This hypothesis may be related to the scarcity of reports involving viral identification and characterization of associated diseases in Santa Catarina state, likely stemming from the belief that BVDV is of few relevance to the state's cattle population.

Conclusion

This study determined the occurrence of a BVDV-1b outbreak in a beef cattle herd in Santa Catarina state, characterized by abortions, persistently infected offspring, and congenital malformations. The detection of a BVDV-1b strain highly similar to Chinese isolates underscores the need for continued molecular surveillance and reinforces the potential for international dissemination of pestivirus strains across cattle-producing regions.

Author contributions L.M.: Writing – original draft, Writing – review & editing, Investigation, Data curation, Conceptualization, Methodology.

J.A.W.: Writing – review & editing, Validation, Data curation, Conceptualization.

E.V.R., G.B.: Investigation, Data curation, Conceptualization.
L.F.B., C.R.R., C.W.C.: Writing – review & editing, Investigation, Data curation, Conceptualization, Methodology.
R.A.C.: Writing – review & editing, Investigation, Data curation, Conceptualization, Methodology, Project administration, Validation, Supervision.

Funding This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina, (FAPESC, 048/2022 - Nº: 2023TR557), PROAP/CAPES (Finance code 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 23/2551-0002221-4) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 405786/2022-0), Brazil.

Declarations

Conflict of interest The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Agerholm JS et al (2015) Virus-induced congenital malformations in cattle. *Acta Vet Scand* 57:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0093-x>
- Asín J et al (2021) An outbreak of abortions, stillbirths and malformations in a Spanish sheep flock associated with a bovine viral diarrhoea virus 2-contaminated Orf vaccine. *Transbound Emerg Dis* 68:233–239. <https://doi.org/10.1111/tbed.13711>
- Ballarin C et al (2016) The brain of the domestic *Bos taurus*: weight, encephalization and cerebellar quotients, and comparison with other domestic and wild cetartiodactyla. *PLoS One* 11:e0154580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154580>
- Bianchi E et al (2017) Natural outbreak of BVDV-1d-induced mucosal disease lacking intestinal lesions. *Vet Pathol* 54:242–248. <https://doi.org/10.1177/0300985816653795>
- Blanchard PC et al (2010) An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *J Vet Diagn Invest* 22:128–131. <https://doi.org/10.1177/104063871002200128>
- Collins ME, Desport M, Brownlie J (1999) Bovine viral diarrhoea virus quasispecies during persistent infection. *Virology* 259:85–98. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9736>
- Collins ME et al (2009) Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. *Vet Microbiol* 138:289–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.026>
- Costa LS et al (2022) *Neospora caninum*-associated abortions in cattle from Southern Brazil: anatomopathological and molecular characterization. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 36:100802. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100802>
- Dall Agnol AM et al (2021) Severe outbreak of bovine neonatal diarrhoea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Braz J Microbiol* 52:2547–2553. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00543-1>
- Damman A et al (2015) Modelling the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a beef cattle herd and its impact on herd productivity. *Vet Res* 46:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0202-2>
- Evans CA et al (2021) Pathological lesions of lambs infected in utero with bovine viral diarrhoea virus type 1c (BVDV-1c). *Vet Rec* 188:3. <https://doi.org/10.1136/vr.105672>
- Fischer M et al (2013) Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic PCR systems. *Virology* 441:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.virus.2013.05.010>
- Fritzen JT et al (2024) Outbreak of persistently infected heifer calves with bovine viral diarrhoea virus subgenotypes 1b and 1d in a BVDV-vaccinated open dairy herd. *Acta Trop* 254:107198. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107198>
- Gates MC et al (2014) Not all cows are epidemiologically equal: quantifying the risks of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) transmission through cattle movements. *Vet Res* 45:1–15. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-19>
- Golchin D et al (2023) Congenital cerebral and cerebellar anomalies in relation to bovine viral diarrhoea virus and Akabane virus in newborn calves. *Acta Vet Hung* 71:34–40. <https://doi.org/10.1556/004.2023.00004>
- Goto Y et al (2021) Clinical analysis for long-term sporadic bovine viral diarrhoea transmitted by calves with an acute infection of bovine viral diarrhoea virus 2. *Viruses* 13:621. <https://doi.org/10.3390/v13040621>
- Hansen TR et al (2010) Maternal and fetal response to fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Reprod Immunol* 64:295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00850.x>
- Heidari Z et al (2021) Development and comparison of cross-linking and non-crosslinking probe-gold nanoparticle hybridization assays for direct detection of unamplified bovine viral diarrhoea virus-RNA. *BMC Biotechnol* 21:30. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00689-1>
- Hewicker-Trautwein M et al (1995) Brain lesions in calves following transplacental infection with bovine-virus diarrhoea virus. *J Vet Med B* 42:65–77. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1995.tb00236.x>
- Kane SE et al (2015) Bovine viral diarrhoea virus outbreak in a beef cow herd in South Dakota. *J Am Vet Med Assoc* 246:1358–1362. <https://doi.org/10.2460/javma.246.12.1358>
- Lunardi M et al (2008) Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Res Vet Sci* 85:599–604. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.01.005>
- Marian L et al (2024) Uncommon bovine viral diarrhoea virus subtype 1e associated with abortions in cattle in Southern Brazil. *J Vet Diagn Invest* 36:115–119. <https://doi.org/10.1177/10406387231221591>
- Maxie GM, Youssef S (2007) Nervous system. In: Maxie GM (ed) *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*, 5th edn. Saunders Elsevier, Edinburgh, 319–320
- McManus C et al (2016) Dynamics of cattle production in Brazil. *PLoS One* 11:e0147138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147138>
- Newcomer BW et al (2015) Efficacy of bovine viral diarrhoea virus vaccination to prevent reproductive disease: a meta-analysis. *Theriogenology* 83:360–365. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.016>
- Mosena ACS et al (2022) Temporal analysis of bovine pestivirus diversity in Brazil. *Braz J Microbiol* 53:1675–1682. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00686-1>
- Nodar L et al (2023) Long-term acute infections during a bovine viral diarrhoea virus (BVDV) outbreak in dairy farm from Galicia (NW Spain). *Vet Immunol Immunopathol* 262:110634. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110634>
- Otonari RA et al (2014) The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 46:87–92. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0452-6>
- Postler TS et al (2023) Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within

- the family *Flaviviridae*. Arch Virol 168:224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05808-0>
30. Qi L et al (2019) Neighbourhood contacts and trade movements drive the regional spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). Vet Res 50:30. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0647-3>
 31. Reardon F et al (2018) Quantifying the role of Trojan dams in the between-herd spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Ireland. Prev Vet Med 152:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.007>
 32. Richter V et al (2017) A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. Vet J 220:80–87. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005>
 33. Ridpath JF et al (2003) Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhoea virus in calves. Am J Vet Res 64:65–69. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.65>
 34. Scharnböck B et al (2018) A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. Sci Rep 8:14420. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32831-2>
 35. Spetter MJ et al (2020) Detection methods and characterization of bovine viral diarrhoea virus in aborted fetuses and neonatal calves over a 22-year period. Braz J Microbiol 51:2077–2086. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00327-z>
 36. Spetter MJ et al (2022) Temporal and geographic dynamics of bovine viral diarrhoea virus in American countries. Res Vet Sci 153:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.015>
 37. Sun Y et al (2024) Viromics-based precision diagnosis of reproductive abnormalities in cows reveals a reassortant Akabane disease virus. BMC Vet Res 20:539. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04260-3>
 38. Vilcek S et al (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch Virol 136:309–323. <https://doi.org/10.1007/BF01321060>
 39. Weber MN et al (2021) Insights into the origin and diversification of bovine viral diarrhoea virus 1 subtypes. Arch Virol 166:607–611. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04885-0>
 40. Withoef JA et al (2024) Sheep abortions associated with *Neospora Caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in multiple flocks from Southern Brazil. Vet Res Commun 48:1–7. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10141-4>
 41. Wang L et al (2020) Origin and transmission of bovine viral diarrhoea virus type 1 in China revealed by phylodynamic analysis. Res Vet Sci 128:162–169. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.12.017>
 42. WOAH (2024) Chap. 3.4.7. Bovine viral diarrhoea. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2024. <http://www.woah.org/en/disease/bovine-viral-diarrhoea/>
 43. Zachary JF (2021) Pathologic basis of veterinary disease. Louis, Mosby

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

CAPÍTULO III

1. **MANUSCRITO 2: DOENÇA DAS MUCOSAS ASSOCIADA AO BVDV-1b E 1e EM BOVINOS DO SUL DO BRASIL**

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno associado a distúrbios reprodutivos, respiratórios, digestivos e imunossupressão. A infecção fetal no período de imunotolerância pode originar animais persistentemente infectados (PI). Nesses animais, a emergência ou superinfecção por variantes citopáticas relacionadas pode desencadear a doença das mucosas (DM), condição geralmente fatal caracterizada por lesões erosivas e ulcerativas do trato gastrointestinal e tegumentar. O objetivo deste estudo é caracterizar os aspectos anatomopatológicos, virológicos, moleculares e filogenéticos da doença das mucosas em bovinos. O Bovino 1, fêmea, 24 meses, da raça Hereford, apresentou diarreia, emagrecimento, claudicação, sialorreia, além de lesões orais e cutâneas. O Bovino 2, macho, quatro meses, da raça Holandesa, apresentou emagrecimento, diarreia intermitente e desidratação. Os animais foram submetidos à necropsia, com fragmentos de todos os órgãos colhidos para avaliação histopatológica. Para pesquisa do BVDV, amostras de soro foram submetidas à RT-PCR utilizou-se os primers 324F/326R da região 5' UTR dos pestivírus. Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento pelo método Sanger e análise filogenética. Fragmentos de fígado e baço foram destinados ao cultivo e isolamento viral em células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) por oito dias a 37°C em estufa 5% de CO₂. A análise anatomopatológica do Bovino 1 demonstrou glossite ulcerativa, estomatite erosiva, esofagite erosiva e ulcerativa, ruminite erosiva e ulcerativa, abomasite erosiva, além de dermatite ulcerativa e crostosa em plano nasal e em região podal. No Bovino 2, observou-se ruminite ulcerativa, abomasite erosiva e depleção linfóide em placas de Peyer do íleo. Amostras de soro dos dois bovinos foram positivas para BVDV na RT-PCR. O sequenciamento e análise filogenética caracterizaram as sequências obtidas como BVDV-1e (UDESC/11/2025) e BVDV-1b (UDESC/12/2025), pertencentes ao Bovino 1 e 2, respectivamente. Os isolados de ambos os casos induziram efeito citopático caracterizado por vacuolização citoplasmática e formação de placas celulares entre 48 e 96h pós-inoculação em cultivo celular. Este estudo demonstra padrões lesionais distintos em quadros não relacionados de doença das mucosas associada ao BVDV-1e e 1b em bovinos do estado de Santa Catarina, Sul do Brasil.

Palavras-chave: ruminantes; virologia; patologia; filogenia.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a major pathogen associated with reproductive, respiratory, and digestive disorders, as well as immunosuppression. Fetal infection during the period of immunotolerance can result in the birth of persistently infected (PI) animals. In these individuals, the emergence of, or superinfection by, related cytopathic variants can trigger mucosal disease (MD), a typically fatal condition characterized by erosive and ulcerative lesions of the gastrointestinal tract and integumentary system. The aim of this study was to characterize the anatomopathological, virological, molecular, and phylogenetic aspects of mucosal disease in cattle. Bovine 1, a 24-month-old Hereford female, presented with diarrhea, weight loss, lameness, sialorrhea, and oral and cutaneous lesions. Bovine 2, a four-month-old Holstein male, showed weight loss, intermittent diarrhea, and dehydration. Both animals were subjected to necropsy, and tissue samples from all organs were collected for histopathological evaluation. For BVDV detection, serum samples were subjected to RT-PCR using primers 324F/326R targeting the 5' UTR region of pestiviruses. Amplified products were sequenced by the Sanger method and analyzed phylogenetically. Liver and spleen fragments were used for viral isolation in MDBK (Madin-Darby bovine kidney) cells for eight days at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Anatomopathological analysis of Bovine 1 revealed ulcerative glossitis, erosive stomatitis, erosive and ulcerative esophagitis, erosive and ulcerative rumenitis, erosive abomasitis, and ulcerative and crusting dermatitis affecting the nasal planum and podal region. In Bovine 2, ulcerative rumenitis, erosive abomasitis, and lymphoid depletion in the ileal Peyer's patches were observed. Serum samples from both animals were positive for BVDV by RT-PCR. Sequencing and phylogenetic analysis identified the obtained sequences as BVDV-1e (UDESC/11/2025) and BVDV-1b (UDESC/12/2025), corresponding to Bovine 1 and Bovine 2, respectively. Viral isolates from both cases induced cytopathic effects characterized by cytoplasmic vacuolization and plaque formation between 48 and 96 hours post-inoculation in cell culture. This study demonstrates distinct lesion patterns in unrelated cases of mucosal disease associated with BVDV-1e and BVDV-1b in cattle from Santa Catarina state, southern Brazil.

Keywords: ruminants; virology; pathology; phylogeny.

1.1 INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*. É um importante patógeno para a bovinocultura em todo o mundo, acarretando prejuízos produtivos consideráveis (LANYON et al., 2014). De acordo com as atualizações taxonômicas recentes, o vírus pode ser classificado em *Pestivirus bovis* (BVDV-1), *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus brasiliense* (BVDV-3 ou HoBi-like), todos com capacidade de causar infecções subclínicas, agudas, crônicas e persistentes, dependendo da virulência da cepa e do estado imune do hospedeiro (POSTLER et al., 2023). O vírus ainda pode ser classificado em biótipos citopático (CP) e não citopático (NCP), com base no efeito em culturas celulares (HILBE et al., 2013).

A dinâmica do vírus envolve predominantemente as cepas NCP, que desempenham um papel crítico na manutenção da infecção nos rebanhos. Esse biótipo é responsável pela geração de animais persistentemente infectados (PI), os quais se desenvolvem por infecção fetal entre o 40º e o 120º dia de gestação, anterior à maturação da competência imunológica do feto (LANYON et al., 2014). Os animais PI nascem imunotolerantes e apresentam viremia persistente, atuando como reservatórios biológicos e fontes contínuas de disseminação viral. Esses indivíduos possuem uma expectativa de vida reduzida, sendo altamente vulneráveis a infecções secundárias e progressão para a doença das mucosas (DM) (HANSEN et al., 2010).

O termo doença das mucosas refere-se a uma manifestação grave e frequentemente fatal do BVDV, que resulta da infecção simultânea entre uma cepa CP antigenicamente semelhante ou, mais frequentemente, por mutações na cepa NCP já circulante no animal PI (BIANCHI et al., 2017). O quadro é caracterizado por lesões ulcerativas e necróticas localizadas no tegumento e mucosas do trato digestório. Embora haja necessidade do envolvimento de uma cepa CP para a ocorrência da DM, animais com infecções agudas por cepas NCP de alta virulência podem desenvolver uma síndrome semelhante à doença (HILBE et al., 2013).

O objetivo deste estudo é caracterizar os achados anatomopatológicos, virológicos, moleculares e filogenéticos de dois casos distintos envolvendo manifestações tegumentares e gastrointestinais associadas ao BVDV em bovinos de Santa Catarina, Sul do Brasil.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Caracterização dos Casos e Exame Anatomopatológico

O Bovino 1, fêmea, da raça Hereford, 24 meses, prenhe de 5 meses, pertencia a um rebanho de corte composto por 11 bovinos, submetidos à criação extensiva, localizado em Campo Belo do Sul – SC. O Bovino 2, macho, da raça Holandesa, quatro meses, foi adquirido em uma fazenda de produção leiteira e criado como animal de estimação, em Lages – SC.

Foram colhidos aproximadamente 10mL de sangue, por meio de venopunção da jugular, em tubos com e sem anticoagulante e armazenados a -20°C, em freezer convencional. As amostras sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação para a obtenção do soro sanguíneo que foi armazenado a -80°C. Os bovinos foram submetidos à eutanásia *in extremis* de acordo com preceitos humanitários e posteriormente submetidos à necropsia. Amostras de fígado, baço e timo também foram colhidas e armazenadas a -80°C para análises complementares. Fragmentos de todos os órgãos foram acondicionados em formalina tamponada 10%, submetidos ao processamento histológico e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

1.2.2 Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética

O RNA total foi extraído das amostras de soro por meio do método manual TRIzol (TRIzol™ LS Reagent, ThermoFischer Scientific®). Para síntese do DNA complementar utilizou-se o kit High Capacity cDNA (Reverse Transcription, ThermoFischer Scientific®) em um volume de 20 µL contendo 2 µL de tampão de reação (10x), 0,8 µL de dNTP mix (25x), 2 µL Random Primers (10x), 1 µL de MultiScribe RT (50 U/µL) além de 4,2 µL de água livre de nucleases e 10 µL de RNA. As condições do termociclador englobaram quatro passos: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min, seguidos de 4°C até a retirada das amostras.

Após a síntese do cDNA, foi realizada PCR convencional em um volume total de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão (10x), 0,75 µL de MgCl₂ (50µ M), 0,5 µL dNTP (10 µM), 0,1 µL Taq DNA polimerase Platinum® (10 µM) (ThermoFischer Scientific®), além de 0,5 µL do primer 324F e 0,5 µL do primer 326R (10 µM), direcionados à amplificação de um produto de aproximadamente 288 pb da região 5'UTR do genoma dos pestivírus (VILCEK et al., 1994). As condições do termociclador foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos compostos por

desnaturação a 34°C por 30 segundos, anelamento a 56,2°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 10 min, seguido por espera a 4°C.

Os produtos de amplificação foram purificados pelo método manual e submetidos ao sequenciamento Sanger. O programa BioEdit™ 7.2 foi utilizado para edição e montagem das sequências parciais de aproximadamente 288 bp da 5'UTR obtida, que, posteriormente, foram submetidas à ferramenta *nucleotide* BLAST do *GenBank* para comparação e confirmação dos genótipos e subgenótipos por meio de alinhamento local. Para análise filogenética, sequências de pestivírus previamente depositadas no *GenBank*, juntamente com as sequências do BVDV obtidas destes casos, foram alinhadas através do CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). Para construção da árvore filogenética, foram realizadas análises pelo *software* MEGA12, com determinação da história evolutiva pelo método *Maximum Likelihood* com 1000 *bootstraps* e as distâncias evolutivas calculadas por Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980).

1.2.3 Cultivo e Isolamento Viral

Fragmentos de aproximadamente 1 cm³ das amostras de fígado e baço foram reservados para o isolamento viral. O material foi fragmentado em pequenas porções e transferido para um tubo cônico de 15 mL contendo 3 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose (DMEM, Sigma®, REF. D1152), suplementado com piruvato de sódio, penicilina, estreptomicina e bicarbonato de sódio. A suspensão foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e submetida a dois ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento, com nova homogeneização após cada ciclo. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1000 × g por 3 minutos. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente recuperado com seringa, filtrado através de filtro de seringa de 0,22 µm e inoculado todo sobrenadante recuperado, entre 1,5 mL e 2,5 mL, diretamente em frascos de cultivo celular de 25 cm² contendo células da linhagem MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) com 24 horas de crescimento, ocupando aproximadamente 50% da área do frasco. As culturas foram incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 2 horas para adsorção viral. Após esse período, o inóculo foi removido e substituído por 3 mL do mesmo meio de cultivo (DMEM) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) estéril inativado (Nova Biotecnologia®, REF. 10-bio500i). As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por oito dias, com troca completa do meio no quinto dia de incubação e avaliadas diariamente para observação da presença de efeito citopático. Um frasco de cultura

foi submetido às mesmas condições de inoculação usando-se D-MEM como inóculo, nas mesmas condições de cultivo, como controle negativo. O sobrenadante recuperado nessa etapa foi armazenado a -80°C . Ao final do oitavo dia, todo o conteúdo dos frascos (células e sobrenadante) de ambos os bovinos foi coletado e congelado a -80°C para posterior confirmação molecular viral por RT-PCR como descrito no item 1.2.2.

1.3 RESULTADOS

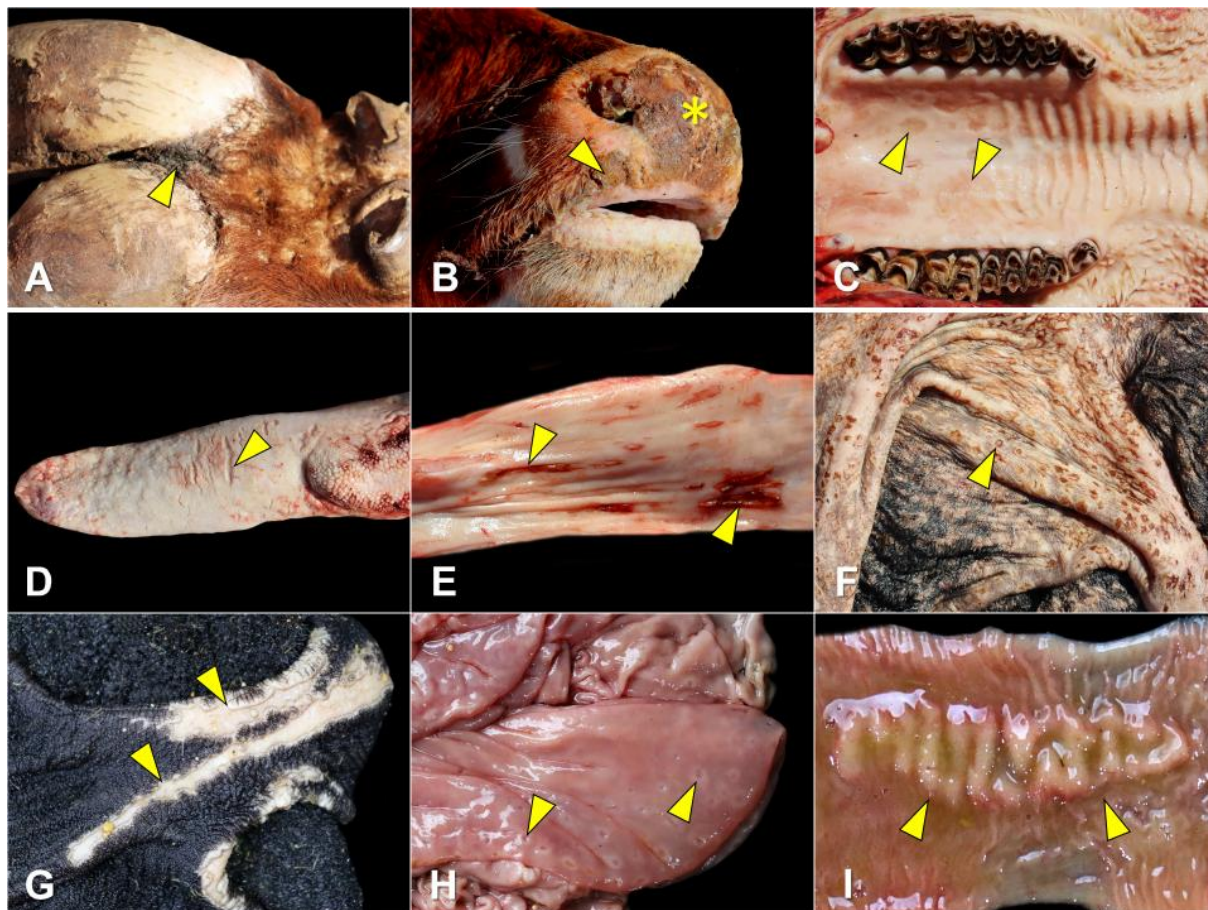
1.3.1 Caracterização dos Casos e Exame Anatomopatológico

Os dois bovinos apresentaram manifestações clínicas crônicas e histórico de baixo desempenho zootécnico. O Bovino 1 manifestou evolução clínica de aproximadamente 20 dias, caracterizada por inapetência, emagrecimento, sialorreia, claudicação e diarreia, bem como lesões orais e cutâneas. O Bovino 2 possuía subdesenvolvimento e quadro clínico de aproximadamente 30 dias de evolução, marcado por emagrecimento, diarreia intermitente, desidratação, apatia, anorexia e decúbito lateral prolongado.

Macroscopicamente, no Bovino 1, em banda coronária e região interdigital de membros torácicos e pélvicos, havia ulcerações de aproximadamente 5 cm, além de deposição de crostas (Figura 1A). Em plano nasal, havia deposição de exsudato purulento, deposição de crostas, além de ulcerações de até 4 cm, que se estendiam até a junção mucocutânea (Figura 1B). Em cavidade oral, havia erosões circulares variando de 1 a 3 cm em região de palato duro (Figura 1C), além de ulcerações lineares de 0,5 a 2 cm em face dorsal da língua (Figura 1D). Ao longo do esôfago, erosões e ulcerações lineares de 0,5 a 2 cm se estendiam desde a porção cervical até a torácica (Figura 1E). Em rúmen, havia múltiplas erosões e ulcerações circulares de 0,5 a 1 cm na mucosa, predominantemente em pilares ruminais (Figura 1F) e, no abomaso, foram observadas erosões de aspecto puntiforme a estrelado de até 0,2 cm na mucosa.

No Bovino 2, ao exame macroscópico, observou-se em rúmen, ulcerações lineares que variavam de 5 a 15 cm na região dos pilares (Figura 1G). Em abomaso, havia erosões puntiformes 0,2 cm na mucosa (Figura 1H). Em intestino delgado, em porção de íleo, as placas de Peyer estavam evidentes, aumentadas e com aspecto edemaciado (Figura 1I)

Figura 1. Lesões macroscópicas em bovinos acometidos pela doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **A - Dígito (Bov. 1):** ulceração de até 5 cm e deposição de crostas em pele da fenda interdigital (seta) e banda coronária. **B - Plano nasal (Bov. 1):** deposição de crostas (seta) e ulcerações de até 4 cm que se estendem até a junção mucocutânea (asterisco). **C – Palato duro (Bov. 1):** erosões circulares de 1 a 3 cm em mucosa (setas). **D - Língua (Bov. 1):** ulcerações lineares de 0,5 a 2 cm em face dorsal (seta). **E - Esôfago (Bov. 1):** erosões e ulcerações lineares de 0,5 a 2 cm em mucosa (setas). **F - Rúmen (Bov. 1):** erosões e ulcerações circulares de até 0,5 a 1 cm em mucosa, predominantemente em pilares ruminais (seta). **G - Rúmen (Bov. 2)** ulcerações lineares que variavam de 5 a 15 cm na região dos pilares (setas). **H - Abomaso (Bov. 2):** erosões puntiformes de até 0,2 cm na mucosa (setas). **I – Íleo (Bov. 2):** placa de Peyer evidentes e aumentadas (setas).



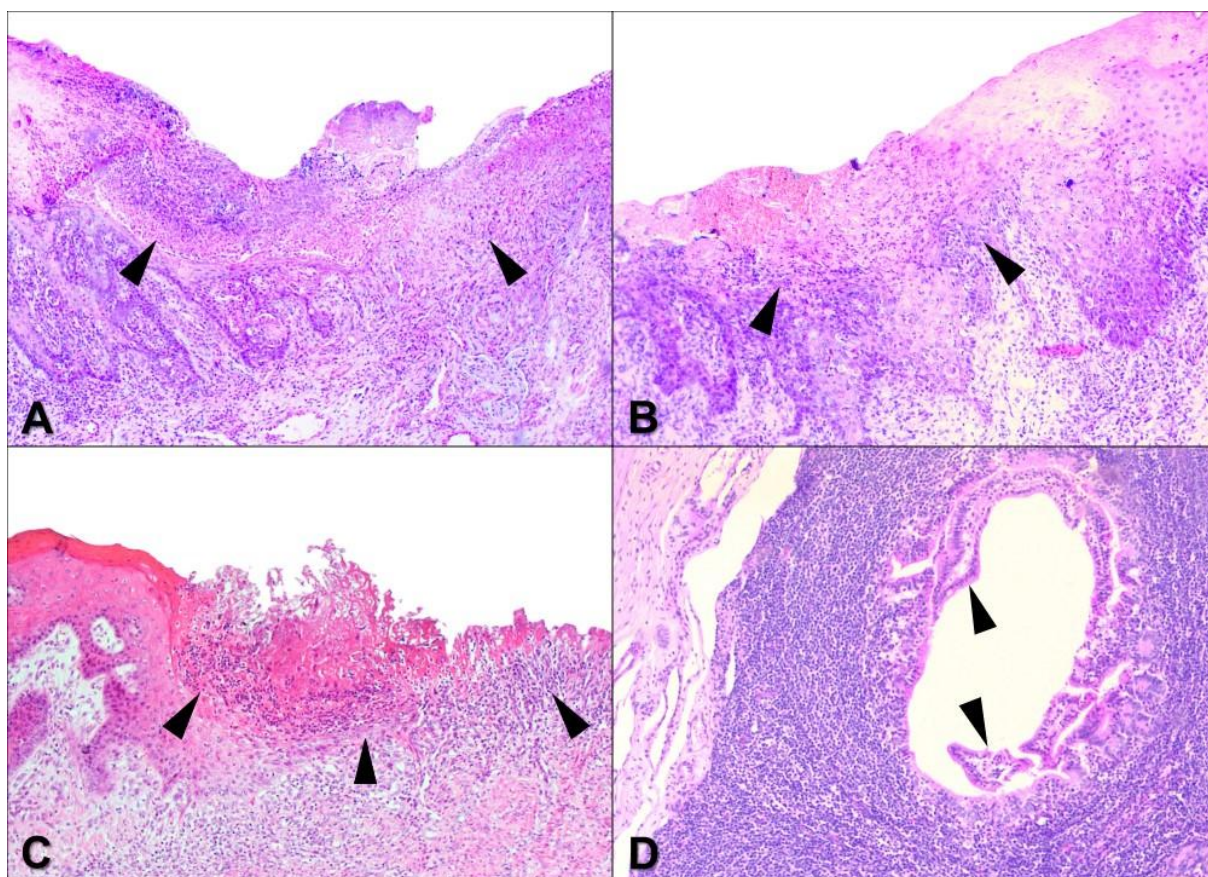
Fonte: arquivo pessoal

Na análise histopatológica do Bovino 1, observou-se glossite ulcerativa (Figura 2A), estomatite erosiva, esofagite erosiva e ulcerativa (Figura 2B), e ruminite erosiva e ulcerativa (Figura 2C). As lesões foram caracterizadas por descontinuidade do epitélio de revestimento, acompanhada por infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de restos necróticos e exsudação fibrinosa. Observou-se, ainda, dermatite ulcerativa e crostosa em região interdigital e banda coronária, além de dermatite ulcerativa e crostosa em plano nasal e junção mucocutânea, caracterizadas por necrose da epiderme e derme, além de infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, associados a exsudação fibrinosa. Havia, ainda, formação de crostas serocelulares compostas por restos necróticos, fibrina, hemácias

e neutrófilos íntegros e degenerados. Em abomaso, havia necrose superficial da mucosa, acompanhada por infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos.

No Bovino 2, além das lesões histológicas em rúmen e abomaso já descritas no Bovino 1, em placas de Peyer da região do Íleo, os folículos linfoides apresentavam arquitetura pouco preservada em meio à marcada depleção folicular central, a qual resultou na formação de cavidades livres de linfócitos que, por vezes, estavam revestidas por uma camada de células epiteliais pavimentosas e preenchidas por criptas e vilosidades herniadas através da submucosa (Figura 2D). A distribuição e intensidade das lesões nos diferentes órgãos estão dispostas na Tabela 1.

Figura 2. Lesões histológicas em bovinos acometidos pela doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **A - Língua (Bov. 1):** ulceração do epitélio de revestimento, acompanhada por infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de restos necróticos e exsudação fibrinosa (setas). **B - Esôfago (Bov. 1):** erosão da mucosa, acompanhada por infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos (setas). **C - Rúmen (Bov. 2):** ulceração da mucosa, acompanhada por infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos e exsudação fibrinosa (setas). **D - Íleo (Bovino 2):** em placas de Peyer, perda da arquitetura linfocelular e formação de cavitações na região central de folículos linfoides, revestidas internamente por epitélio achatado e microvilosidades curtas (setas).



Fonte: arquivo pessoal

Tabela 1. Distribuição e gravidade das lesões anatomopatológicas observadas em bovinos com doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil.

Órgão	Bovino 1	Bovino 2
Região interdigital e banda coronária	++	-
Plano nasal	+++	-
Cavidade oral	+++	-
Esôfago	++	-
Rúmen	+++	+++
Abomaso	+	++
Placas de Peyer	-	++

Legenda: Grau de lesão: + discreta; ++ moderada; +++ acentuada; - ausente
Elaborado pelo autor, 2026.

1.3.2 Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética

As amostras de soro dos bovinos foram positivas para o BVDV na RT-PCR. As sequências obtidas pelo sequenciamento genético demonstraram níveis variados de semelhança com sequências de pestivírus previamente depositas no *GenBank* (Tabela 2). A sequência obtida do Bovino 1 (UDESC/11/2025) referente ao BVDV-1e apresentou similaridade superior a 97% com sequências brasileiras, europeias e sul-americanas. A sequência proveniente do Bovino 2 (UDESC/12/2025), classificada como BVDV-1b, mostrou similaridade superior a 98% com sequências brasileiras, europeias e asiáticas.

Tabela 2. Análise comparativa de similaridade nucleotídica entre sequências de nacionais e internacionais do BVDV-1 depositadas no *GenBank* com as sequências obtidas de bovinos com doença das mucosas (DM) no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil.

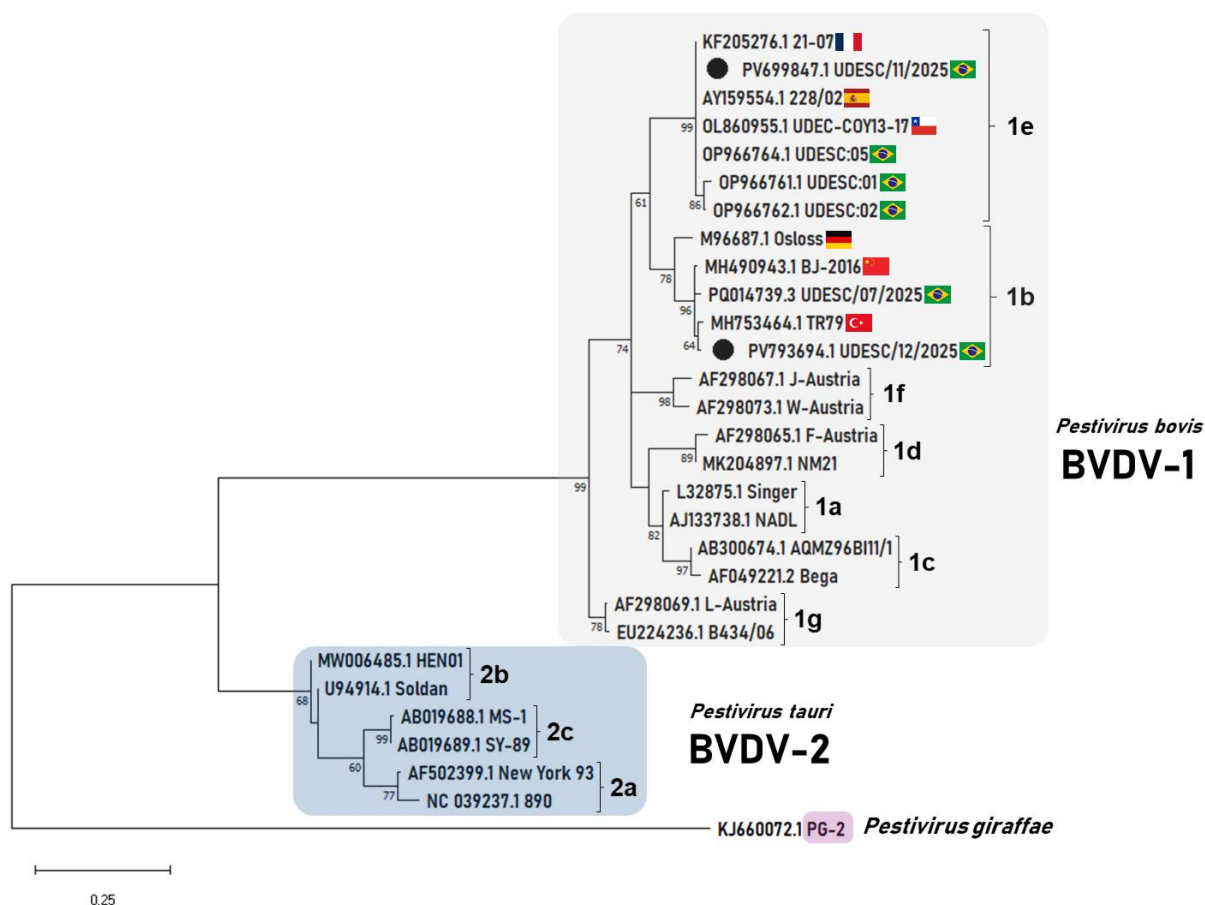
Sequência	Genótipo e subgenótipo	Sequências similares	Origem	Grau de similaridade
UDESC/11/2025 Bovino 1	BVDV-1e	UDESC:05	Brasil	100%
		UDEC-COY13-17	Chile	
		bo228/02	Espanha	
		21-07	França	
		LV/LF15/12	Brasil	99,5%
		LV/152/18		99,1%
UDESC/12/2025 Bovino 2	BVDV-1b	UDESC:01		98,2%
		UDESC:02		97,1%
		BJ-2016	China	98,9%
		TR79	Turquia	98,8%
		UDESC/06/2025	Brasil	98,5%
		UDESC/07/2025		

Elaborado pelo autor, 2026.

A árvore filogenética gerada utilizando sequências de diferentes espécies e subgenótipos de pestivírus previamente depositadas *GenBank*, bem como cepas do BVDV de alta similaridade com os isolados deste estudo, distribuiu as sequências em

três ramos distintos (Figura 3). Um dos ramos correspondeu ao *Pestivirus bovis* (BVDV-1), no qual foram alocadas as sequências dos Bovinos 1 e 2, as quais agruparam-se, respectivamente, com sequências do BVDV-1e e 1b, confirmando os genótipos e subgenótipos de cada uma. Os outros ramos corresponderam a sequências dos *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus giraffae* (GPeV).

Figura 3. Árvore filogenética baseada na região 5'UTR do genoma viral dos pestivírus, utilizando sequências proveniente de dois bovinos com doença das mucosas, bem como sequências brasileiras e internacionais dos *Pestivirus bovis* (BVDV-1), *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus giraffae*, analisada pelo método *Maximum Likelihood* com 1000 *bootstraps* e modelo Kimura 2-parâmetros. As sequências detectadas neste estudo foram destacadas pelo símbolo distintivo (●).



Elaborada pelo autor, 2026.

1.3.3 Cultivo e Isolamento Viral

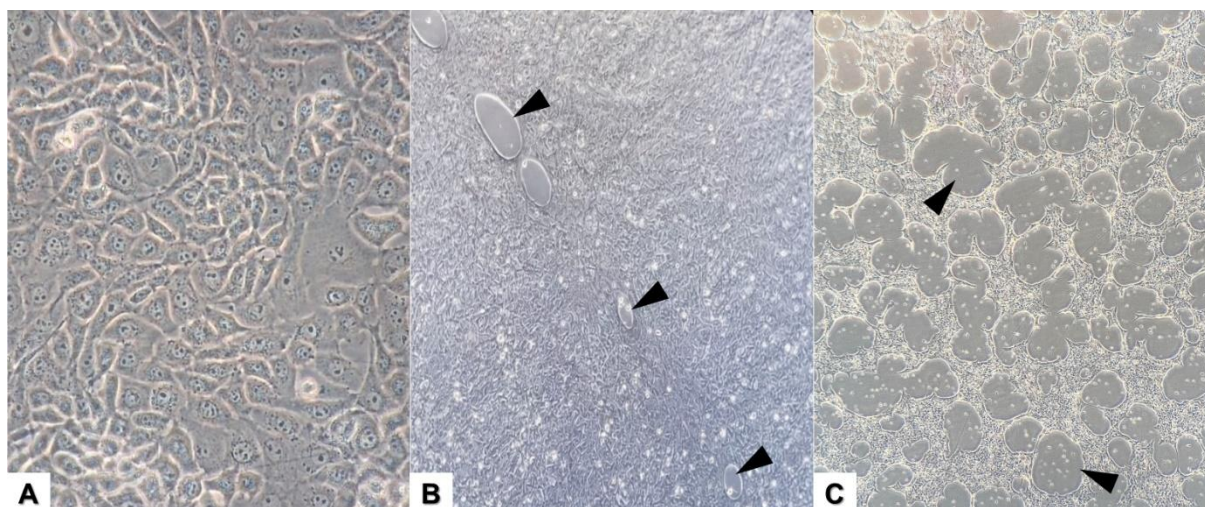
As garrafas dos Bovinos 1 e 2 foram avaliadas em conjunto com uma garrafa controle, composta por um tapete celular uniforme (Figura 4A). Nas células inoculadas com a amostra do Bovino 1, observou-se detritos celulares nas primeiras 24h pós-inoculação, seguida de crescimento normal até 48h. Em 96h, surgiram pequenas placas resultantes da vacuolização celular (Figura 4B) e no quinto dia (120h), as placas mantiveram-se estáveis, com cerca de dez formações visíveis. Após a troca de meio, observou-se preenchimento total das áreas afetadas e do efeito citopático,

seguido de estabilização e ausência de novas alterações até 192h, indicando redução da atividade viral após a remoção do sobrenadante.

Nas células inoculadas com amostras do Bovino 2, observou-se crescimento celular normal nas primeiras 24h pós-inoculação. Em 48h, notou-se aumento no número de vacúolos e lise celular com aparecimento de pequenas placas celulares. No terceiro dia (72h), as placas intensificaram-se e tornaram-se difusas por toda a garrafa (Figura 4C), permanecendo apenas uma pequena região preservada. Em 96h, o efeito citopático manteve-se evidente, com aumento do número e do tamanho das placas. No quinto dia (120h), observou-se estabilidade do padrão, com lise celular generalizada. Após a troca de meio, as placas e o efeito citopático diminuíram progressivamente até 192h, indicando redução da atividade viral após a remoção do sobrenadante.

As células e sobrenadantes do cultivo celular dos dois os bovinos foram positivos para o BVDV na RT-PC.

Figura 4. Cultivo celular e isolamento viral em células MDBK com amostras de bovinos infectados pelo BVDV-1b e 1e no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **A – Cultivo controle:** tapete celular íntegro. **B - Bovino 1:** efeito citopático inicial, com aparecimento de placas celulares 96h pós-inoculação (setas). **C – Bovino 2:** intensificação e difusão das placas celulares na garrafa 72h pós-inoculação.



Fonte: arquivo pessoal

1.4 DISCUSSÃO

Lesões tegumentares e gastrointestinais podem estar associado a infecções agudas graves ocasionadas pelo BVDV, mas ocorre principalmente em infecções persistentes sob a forma da doença das mucosas, com o envolvimento de genótipos e subgenótipos variados (BIANCHI et al., 2017; BIANCHI et al., 2018). Lesões semelhantes às observadas em casos de DM foram associados ao BVDV-1b, detectado no Bovino 2, em bovinos confinados dos Estados Unidos, que

apresentaram extenso acometimento da mucosa, porém durante um surto de doença aguda (HESSMAN et al., 2012). Na Argentina, o subgenótipo 1b também foi responsável por surtos de doença em bovinos com dermatite generalizada (ODEÓN et al., 2003), além de dois episódios individuais de DM típica, associadas a isolados CP, como neste bovino (PECORA et al., 2014). No Brasil, não há relatos envolvendo o BVDV-1b a quadros clássicos de DM, sendo o subgenótipo associado a um surto com lesões gastrointestinais similares às encontradas neste estudo, mas sem confirmação de cepas CP envolvidas (LUNARDI et al., 2008).

Com relação ao envolvimento do BVDV-1e no desenvolvimento da doença, buscas realizadas em plataformas de pesquisa científica, como PubMed e Google Scholar, demonstraram a ocorrência de um único estudo na Suíça, que associou esse subgenótipo a lesões cutâneas e gastrointestinais em três bovinos, sendo o quadro típico da DM caracterizado em apenas um deles (HILBE et al., 2013). Estudos mostraram evidências que correlacionam o BVDV-1e principalmente a falhas reprodutivas, sendo o principal subgenótipo encontrado em bezerros natimortos e fetos abortados, o que permite considerar maior efeito nocivo relacionado a perdas pré-natais e perinatais em relação ao desenvolvimento de outras doenças como a DM (BACHOFEN et al., 2010; MARIAN et al., 2024).

As lesões observadas nos bovinos deste estudo acometeram diferentes regiões do trato digestório e foram associados a isolados CP, confirmando a ocorrência de doença das mucosas (HILBE et al., 2013). A ampla distribuição das lesões digestivas observada no Bovino 1, com ulcerações que se estendiam desde plano nasal e cavidade oral até o abomaso, sem envolvimento dos intestinos, mostrou-se semelhante à observada em um surto no Rio Grande do Sul. Adicionalmente, os animais também desenvolveram dermatite crostosa, porém, em regiões axilar, abdominal e inguinal (BIANCHI et al., 2017), diferente do ocorrido no bovino deste estudo, que apresentou lesões podais. Em outro surto em bezerros do Mato Grosso, as lesões digestivas estenderam-se pelos mesmos órgãos, mas com envolvimento de intestinos, enquanto no tegumento, dermatite crostosa interdigital também ocorreu (CRUZ et al., 2018). Assim como no Bovino 1, novilhas da Argentina apresentaram lesões tegumentares na fenda interdigital e banda coronária associadas a manifestações gastrointestinais, mas com ulcerações restritas à cavidade oral e esôfago (ODEÓN et al., 2003).

Não houve o acometimento do tegumento no Bovino 2, no qual foram observadas lesões restritas ao sistema digestório (LUNARDI et al., 2008; HESSMAN et al., 2012). Esse padrão de lesões também foi relatado em um surto envolvendo *Pestivirus braziliense* (HoBi-like), que apresentou lesões em cavidade oral, língua, esôfago e omaso, porém o rúmen e os intestinos foram preservados (WEBER et al., 2016). Esse padrão de distribuição das lesões digestivas observado no Bovino 2 parece incomum, visto que em todos os relatos associados ao BVDV em que há o envolvimento de rúmen, abomaso ou placas de Peyer, há o comprometimento de outras regiões, como cavidade oral e esôfago (ODEÓN et al., 2003; DECARO et al., 2014; CRUZ et al., 2018).

A variação na distribuição das lesões encontradas nos bovinos deste estudo pode estar relacionada a aspectos individuais, como a imunidade, bem como o tempo de evolução da doença (BRODERSEN, 2014). Em quadros agudos, as lesões podem se apresentar em regiões mais superficiais e, portanto, mais evidentes em cavidade oral e esôfago, como observado no Bovino 1 (BIANCHI et al., 2017). As ulcerações ruminais acentuadas e o acometimento do tecido linfóide das placas de Peyer sugerem um quadro subagudo a crônico, visto que, conforme a doença progride, lesões brandas podem cicatrizar, enquanto lesões profundas permanecem ou se agravam (LIEBLER-TENORIO et al., 2000; BIANCHI et al., 2017; BIANCHI et al., 2018).

Assim como os achados macroscópicos, as lesões histológicas em tegumento e sistema digestório destes bovinos são típicas e frequentemente associadas à infecção pelo BVDV (ODEÓN et al., 2003; BIANCHI et al., 2017; BIANCHI et al., 2018; CRUZ et al., 2018). Ao longo da mucosa digestiva dos Bovinos 1 e 2, erosões e ulcerações caracterizadas por necrose epitelial foram as principais lesões e geralmente estavam associadas a componentes inflamatórios mistos e exsudação fibrinosa (HESSMAN et al., 2012; BIANCHI et al., 2017). Na região podal do Bovino 1, histologicamente, além das formações crostosas, a epiderme apresentava-se ulcerada, como frequentemente é relatado em bovinos com lesões em fenda interdigital e banda coronária (ODEÓN et al., 2003; BIANCHI et al., 2018).

A caracterização das lesões linfóides representa um desafio em casos naturais de DM, visto que tais alterações teciduais são predominantemente avaliadas em situações experimentais (LIEBLER-TENORIO et al., 2000; TEICHMANN et al., 2000). O colapso dos folículos linfóides e a perda da arquitetura tecidual, caracterizada por

cavidades foliculares centrais no Bovino 2, são típicos de quadros avançados DM e estão associados à falha no processo de regeneração tecidual (TEICHMANN et al., 2000). A depleção severa associada à perda da estrutura folicular em placas de Peyer também foi verificada experimentalmente em quadros de DM de início tardio, quando há demora no desenvolvimento da doença após a aquisição de uma cepa CP (LIEBLER-TENORIO & POHLENZ, 1997; LIEBLER-TENORIO et al., 2000). Lesões similares foram observadas durante infecções naturais também pelo BVDV-1b, porém com maior gravidade em porções intestino grosso (LUNARDI et al., 2008), diferente do observado neste bovino, em que apenas placas de Peyer do íleo foram acometidas.

No que se refere à dispersão geográfica e às relações filogenéticas dos isolados de BVDV identificados neste estudo, a sequência UDESC/11/2025, obtida do Bovino 1 e classificada como BVDV-1e, apresentou elevada similaridade com sequências previamente detectadas em Santa Catarina, incluindo amostras provenientes de fetos abortados (MARIAN et al., 2024) e de líquido folicular (SILVEIRA et al., 2017). Esse padrão evidencia a circulação regional de cepas geneticamente relacionadas, sugerindo a manutenção local de linhagens com ancestralidade comum ao longo do tempo de um subgenótipo, que no Brasil, só ocorre em Santa Catarina (MOSENA et al., 2022). Além disso, todas essas sequências do BVDV-1e detectadas no país, inclusive deste estudo, possuem altos níveis de similaridade com o isolado espanhol bo228/22 (HURTADO et al., 2003), bem como com o francês 21/07 (JACKOVA et al., 2007). Embora haja sequências altamente semelhantes também no Chile, não há relatos sobre a movimentação de gado entre o país andino e o Brasil (HUGUES et al., 2023) e a hipótese de introdução direta da Europa em países sul-americanos via importação de bovinos vivos torna-se mais provável (MOSENA et al., 2022).

Já a sequência UDESC/12/2025 do BVDV-1b, obtida do Bovino 2, mostrou alta similaridade genética com sequências previamente identificadas num surto ocorrido em um rebanho de corte na região da serra catarinense (MARIAN et al., 2025), possivelmente favorecida pela proximidade entre as origens dos casos e comércio local de bovinos (QI et al., 2019). Além disso, houve alta similaridade com isolados internacionais. A semelhança com sequência TR79, obtida de bovinos importados na Turquia (ALPAY et al., 2018), pode estar relacionada ao comércio de animais vivos, visto que milhares de bovinos do Sul do Brasil foram exportados para países do oriente médio nos últimos anos (ERMGASSEN et al., 2020). Com relação à similaridade com

isolados chineses, deve-se considerar uma possível origem ancestral que remete à Ásia, de onde houve intensa importação de gado zebuino até a década de 1960, que coincide com o surgimento e início da diversificação do BVDV-1b no Brasil, datado por volta de 1950 (MOSENA et al., 2022; WEBER et al., 2021).

As células MDBK infectadas com o BVDV oriundo das amostras dos dois bovinos exibiram efeitos citopáticos característicos, incluindo vacuolização citoplasmática, com grandes vacúolos, que por vezes se fundiam formando vacúolos ainda maiores (RANA et al., 2025b). Houve diferença no período em que o efeito citopático evidente se estabeleceu nas amostras dos Bovinos 1 e 2. Essa variação pode estar relacionada à fatores virais intrínsecos, como a virulência, sendo descrita em um estudo experimental já às 24h, com a cepa NADL de alta patogenicidade (BIRK et al., 2008), bem como de forma mais tardia, a partir de 120h pós-inoculação de cepas de campo (RANA et al., 2025b). Alterações celulares semelhantes ou mais acentuadas do que aquelas promovidas pela amostra do Bovino 2 ocorreram em 48h e mostraram-se muito semelhantes em morfologia, bem como período de ocorrência, ao observado em cultivo celular envolvendo uma cepa do BVDV-1d isolada de bezerros com doença respiratória e gastrointestinal grave (HAO et al., 2025).

Por fim, algumas limitações devem ser consideradas. O variado espectro de lesões observado neste estudo poderiam ser melhor caracterizados pela demonstração do antígeno viral intralesional. Entretanto, alguns métodos diagnósticos comumente utilizados para essa finalidade, como a imuno-histoquímica e a hibridização in situ (BIANCHI et al., 2017; HEIDARI et al., 2021), não puderam ser empregados devido à dificuldade de obtenção de insumos e acesso às técnicas no Brasil.

1.5 CONCLUSÃO

Este estudo documenta a ocorrência de lesões erosivas e ulcerativas em porções do tegumento e trato digestório de dois bovinos infectados pelo BVDV, sem correlação epidemiológica direta. A detecção do biótipo citopático em amostras de ambos os bovinos consolidou o primeiro relato de doença das mucosas associada aos subgenótipos BVDV-1b e BVDV-1e no estado de Santa Catarina.

CAPÍTULO IV

1. **MANUSCRITO 3: SÍNDROME NEFRÓTICA ASSOCIADA AO BVDV-1a EM BOVINOS LEITEIROS NO BRASIL**

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um patógeno cosmopolita responsável por manifestações multissistêmicas de gravidade variável, raramente associado à síndrome nefrótica. O objetivo deste estudo é caracterizar os aspectos clínicos, anatomopatológicos, virológicos e moleculares relacionados a três casos de síndrome nefrótica em bovinos da raça Holandês. O Bovino 1, fêmea, 12 meses, apresentou episódios frequentes de pneumonia, além de subdesenvolvimento. O Bovino 2, fêmea, 24 meses, demonstrou subdesenvolvimento, emaciação, pneumonia e tristeza parasitária recorrentes. O Bovino 3, fêmea, oito meses, também exibia pneumonia recorrente e subdesenvolvimento corporal. Os animais foram submetidos à necropsia e exame histopatológico. Amostras de soro foram submetidas à análise bioquímica sérica para verificação de função renal. Amostras de soro e rins foram submetidas à RT-PCR, utilizando os primers 324F/326R direcionados à região 5'UTR dos pestivírus. Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento parcial Sanger e análise filogenética. Fragmentos de baço e rins foram destinados ao cultivo e isolamento viral em células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) por oito dias a 37°C em estufa a 5% de CO₂. Todos os animais apresentaram estado corporal magro, mucosas pálidas e edema subcutâneo multifocal discreto a moderado. Os rins dos três animais estavam diminuídos, esbranquiçados, com múltiplas áreas de retração do parênquima entremeada a nodulações variando de 0,1 a 1 cm, além de estriações esbranquiçadas na cortical. Morfologicamente, havia nefrite intersticial linfoplasmocítica e fibrosante multifocal a coalescente acentuada em todos os bovinos; glomerulonefrite membranoproliferativa multifocal moderada (Bov. 3) a acentuada (Bov. 1 e 2); atrofia e hipertrofia de túbulos multifocais moderadas (Bov. 3) a acentuadas (Bov. 1 e 2). Em pulmões, havia áreas avermelhadas de consolidação em 50% (Bov. 1) e 10% (Bov. 2) da região anteroventral, caracterizadas por broncopneumonia supurativa multifocal moderada (Bov. 1) e discreta (Bov. 2). As placas de Peyer estavam evidentes, aumentadas, com depleção linfóide multifocal acentuada (Bov. 1 e 2) a moderada (Bov. 3). Em baço e linfonodos, observou-se depleção linfóide multifocal moderada em todos os animais. Em fígado, havia colângio-hepatite hiperplásica e fibrosante multifocal acentuada com exemplares de *Fasciola hepatica* intralesionais (Bov. 2). A análise bioquímica sérica demonstrou hipoproteïnemia, hipoalbuminemia, hiperúremia e aumento de creatinina em todos os animais. Amostras de soro e rins foram positivas para o BVDV e a análise filogenética caracterizou as sequências dos três bovinos como BVDV-1a. Os isolados de todos os casos induziram efeito citopático considerável a partir de 72h pós-inoculação. Este estudo descreve uma análise abrangente da síndrome nefrótica associada à infecção pelo BVDV em bovinos leiteiros, ainda não reportada no Brasil.

Palavras-chave: nefropatia; citopatogenicidade; pestivírus; filogenia.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a cosmopolitan pathogen responsible for multisystemic manifestations of varying severity, rarely associated with nephrotic syndrome. The objective of this study is to characterize the clinical, anatomopathological, virological, and molecular aspects related to three cases of nephrotic syndrome in Holstein cattle. Heifer 1 (12 months old) presented with frequent episodes of pneumonia and stunted growth. Heifer 2 (24 months old) showed stunted growth, emaciation, and recurrent pneumonia and tick-borne diseases. Heifer 3 (8 months old) also exhibited recurrent pneumonia and stunted growth. All animals underwent necropsy and histopathological examination. Serum samples were subjected to biochemical analysis to assess renal function. Serum and kidney samples were submitted to RT-PCR using primers 324F/326R targeting the 5'UTR region of pestiviruses. The amplified products underwent partial Sanger sequencing and phylogenetic analysis. Spleen and kidney fragments were used for viral culture and isolation in MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cells for eight days at 37°C in a 5% CO₂ incubator. All animals presented poor body condition, pale mucous membranes, and mild to moderate multifocal subcutaneous edema. The kidneys of all three animals were shrunken and whitish, with multiple areas of parenchymal retraction interspersed with nodules ranging from 0.1 to 1 cm, in addition to whitish striations in the cortex. Morphologically, there was marked multifocal to coalescing lymphoplasmacytic and fibrosing interstitial nephritis in all cattle; multifocal membranoproliferative glomerulonephritis, ranging from moderate (Bov. 3) to marked (Bov. 1 and 2); and multifocal tubular atrophy and hypertrophy, moderate (Bov. 3) to marked (Bov. 1 and 2). In the lungs, reddish areas of consolidation were observed in 50% (Bov. 1) and 10% (Bov. 2) of the anteroventral region, characterized by multifocal suppurative bronchopneumonia, moderate (Bov. 1) and mild (Bov. 2). Peyer's patches were evident and enlarged, with multifocal lymphoid depletion ranging from marked (Bov. 1 and 2) to moderate (Bov. 3). In the spleen and lymph nodes, moderate multifocal lymphoid depletion was observed in all animals. In the liver, there was marked multifocal hyperplastic and fibrosing cholangiohepatitis with intralesional *Fasciola hepatica* specimens (Bov. 2). Serum biochemical analysis demonstrated hypoproteinemia, hypoalbuminemia, hyperuremia, and increased creatinine in all animals. Serum and kidney samples were positive for BVDV, and phylogenetic analysis characterized the sequences from the three cattle as BVDV-1a. Isolates from all cases induced considerable cytopathic effect starting at 72h post-inoculation. This study describes a comprehensive analysis of nephrotic syndrome associated with BVDV infection in dairy cattle, which has not yet been reported in Brazil.

Keywords: nephropathy; cytopathogenicity; pestivirus; phylogeny.

1.1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) representa um dos principais desafios sanitários da bovinocultura mundial, em razão de sua ampla diversidade e distribuição (Sosa et al., 2025). O BVDV pertence ao gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*, e é classificado, atualmente, em *Pestivirus bovis* (BVDV-1), *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus brasilense* (HoBi), os quais possuem diferentes subgenótipos (POSTLER et al., 2023). Os pestivírus são, ainda, classificados em dois biótipos, citopático (CP) e não citopático (NCP), com base em seu efeito em culturas de células (LANYON et al., 2014). A infecção pode resultar em manifestações clínicas variadas, que incluem desde quadros subclínicos até doenças sistêmicas graves, (RANA et al., 2025).

A infecção pelo BVDV resulta em inúmeras condições clínicas e patológicas, cuja gravidade depende do tipo de infecção, biótipo viral, variabilidade genética entre as diferentes cepas, bem como a resposta imunológica dos hospedeiros bovinos, que em conjunto, modulam a suscetibilidade à infecção e a severidade do quadro clínico (BACHOFEN et al., 2010; BRODERSEN, 2014). Apesar de o BVDV estar relacionado a distúrbios reprodutivos, imunossupressores, infecção persistente e doença das mucosas (DM), manifestações incomuns como a síndrome nefrótica já foram atribuídas a infecção pelo BVDV (WHITE et al., 1986; TRANG et al., 2014).

A síndrome nefrótica em bovinos caracteriza-se por um quadro de lesão glomerular que resulta em proteinúria massiva, hipoproteïnemia e edema generalizado (WISEMAN et al., 1980). Essa condição costuma ser secundária a processos inflamatórios ou infecciosos crônicos que geram uma antigenemia persistente, culminando em amiloidose renal ou glomerulonefrites (MURRAY & SHARPE, 2009; WISEMAN et al., 1980). Embora o BVDV seja associado a lesões renais como nefrite intersticial (SOSA et al., 2025) relatos sobre sua participação no estabelecimento de síndrome nefrótica são raros (WHITE et al., 1986; TRANG et al., 2014).

Diante da escassez de estudos sobre a relação BVDV com nefropatia, o objetivo deste trabalho é descrever os achados clínicos, patológicos, virológicos e moleculares de casos de síndrome nefrótica associados à infecção pelo BVDV em bovinos leiteiros.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Caracterização dos Casos e Exame Anatomopatológico

Os casos ocorreram entre agosto de 2024 e abril de 2025, com envolvimento de três bovinos da raça Holandês. O Bovino 1, fêmea, 12 meses, bem como o Bovino 2, fêmea, 24 meses, pertenciam a Fazenda A, localizada no município de Bom Retiro, na região do Planalto do estado, com um rebanho leiteiro composto por 722 animais criados em sistema intensivo *compost-barn*. O Bovino 3, fêmea, oito meses, pertencia à Fazenda B, situada no município de Monte Carlo, na região do Meio-oeste catarinense, com um rebanho leiteiro total de 700 bovinos também criados em sistema intensivo *compost-barn*.

As fazendas (A e B) possuíam rebanhos fechados, com reposição própria, sem introdução de animais de outros criatórios há mais de oito anos. Na Fazenda A, todo o rebanho era imunizado semestralmente contra doenças reprodutivas e respiratórias com a vacina combinada Hiprabovis® 4 (Hipra®). Na Fazenda B, todos os bezerros eram submetidos à imunização intranasal com a vacina viva modificada Inforce® 3 (Zoetis®) na primeira semana de vida, enquanto animais com mais de seis meses recebiam a vacina inativada Bovigen Repro Total SE® (Virbac®) para doenças reprodutivas e respiratórias. As fazendas eram constantemente visitadas por caminhões fornecedores de insumos, bem como veterinários responsáveis pela execução de manejos gerais.

Os bovinos foram submetidos a eutanásia *in extremis* de acordo com preceitos humanitários e posteriormente à necropsia. Fragmentos de todos os órgãos foram colhidos em formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para exame histopatológico e corados com hematoxilina e eosina (HE). Secções histológicas dos rins foram submetidas às técnicas histoquímicas de Tricrômico de Masson, Vermelho Congo e Periodic Acid–Schiff (PAS). Amostras de baço, timo e rins, além de sangue total para obtenção de soro, também foram colhidas e armazenadas a -80 °C para análises complementares.

1.2.2 Exame Bioquímico Sérico

Amostras de soro dos três bovinos foram submetidas ao exame bioquímico em um Analisador Bioquímico Automático Labmax Plenno (Labtest®) para determinação de analitos séricos relacionados com a função renal como albumina, proteína total, ureia e creatinina, considerando os valores de referência para bovinos estabelecidos na literatura (BRAUN & LEFEBVRE, 2008).

1.2.3 Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética

Amostras de soro e rins dos três bovinos foram submetidas à extração de RNA pelo método manual TRIzol (TRIzol™ LS Reagent, ThermoFischer Scientific®). Para síntese do DNA complementar utilizou-se o kit High Capacity cDNA (Reverse Transcription, ThermoFischer Scientific®) em um volume de 20 µL contendo 2 µL de tampão de reação (10x), 0,8 µL de dNTP mix (25x), 2 µL Random Primers (10x), 1 µL de MultiScribe RT (50 U/µL) além de 4,2 µL de água livre de nucleases e 10 µL de RNA. As condições do termociclador englobaram quatro passos: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min, seguidos de 4°C até a retirada das amostras.

Após a síntese do cDNA, foi realizada PCR convencional em um volume total de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão (10x), 0,75 µL de MgCl₂ (50µ M), 0,5 µL dNTP (10 µM), 0,1 µL Taq DNA polimerase Platinum® (10 µM) (ThermoFischer Scientific®), além de 0,5 µL do primer 324F e 0,5 µL do primer 326R (10 µM), direcionados à amplificação de um produto de aproximadamente 288 pb da região 5'UTR do genoma dos pestivírus (VILCEK et al., 1994b). As condições do termociclador foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos compostos por desnaturação a 34°C por 30 segundos, anelamento a 56,2°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 10 min, seguido por espera a 4°C.

Amostras de sangue total e fragmentos de baço foram submetidos à detecção molecular do *Ovine gammaherpesvirus 2* (OvHV-2) por meio da técnica de PCR convencional. O protocolo visou à amplificação de um fragmento de 422 pb da região *TEG* do genoma viral (BAXTER et al., 1993).

Os produtos de amplificação da PCR para o BVDV foram purificados pelo método manual e submetidos ao sequenciamento genético Sanger. O programa BioEdit™ 7.2 foi utilizado para edição e montagem das sequências parciais de aproximadamente 288 bp da 5'UTR obtidas, que, posteriormente, foram submetidas à ferramenta *nucleotide* BLAST do *GenBank* para comparação e confirmação dos

genótipos e subgenótipos por meio de alinhamento local. Para análise filogenética, sequências de cepas de pestivírus previamente depositadas no *GenBank*, juntamente com as sequências do BVDV obtidas destes casos, foram alinhadas através do CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). Para construção da árvore filogenética, foram realizadas análises pelo *software* MEGA12, com determinação da história evolutiva pelo método *Maximum Likelihood* com 1000 *bootstraps* e as distâncias evolutivas calculadas por Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980).

1.2.4 Cultivo e Isolamento Viral

Fragmentos de aproximadamente 1 cm³ de baço e rim foram reservados para o isolamento viral. O material foi fragmentado em pequenas porções e transferido para um tubo cônico de 15 mL contendo 3 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose (DMEM, Sigma®, REF. D1152), suplementado com piruvato de sódio, penicilina, estreptomicina e bicarbonato de sódio. A suspensão foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e submetida a dois ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento, com nova homogeneização após cada ciclo. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1000 × g por 3 minutos. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente recuperado com seringa, filtrado através de filtro de seringa de 0,22 µm e inoculado todo sobrenadante recuperado, entre 1,5 mL e 2,5 mL, diretamente em frascos de cultivo celular de 25 cm² contendo células da linhagem MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) com 24 horas de crescimento, ocupando aproximadamente 50% da área do frasco. As culturas foram incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 2 horas para adsorção viral. Após esse período, o inóculo foi removido e substituído por 3 mL do mesmo meio de cultivo (DMEM) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) estéril inativado (Nova Biotecnologia®, REF. 10-bio500i). As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por oito dias, com troca completa do meio no quinto dia de incubação e avaliadas diariamente para observação da presença de efeito citopático. Um frasco de cultura foi submetido às mesmas condições de inoculação usando-se D-MEM como inóculo, nas mesmas condições de cultivo, como controle negativo. O sobrenadante recuperado nessa etapa foi armazenado a –80°C. Ao final do oitavo dia, todo o conteúdo dos frascos (células e sobrenadante) dos três bovinos foi coletado e congelado a –80°C para posterior confirmação molecular viral por RT-PCR como descrito no item 6.2.3.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterização Clínica e Anatomopatológica

O histórico sanitário da Fazenda A evidenciou falhas reprodutivas caracterizadas por dois abortos, bem como doenças respiratórias e quadros de mastite recorrentes. Quanto à Fazenda B, havia problemas de longa data relacionados a doenças respiratórias recidivantes, com isolamento de agentes bacterianos e virais associados, como *Pasteurella* spp. e vírus respiratório sincicial bovino (BRSV).

Os três bovinos apresentaram quadros crônicos de baixo desempenho zootécnico. O Bovino 1 (Fazenda A), manifestou episódios recorrentes de pneumonia e diarreia ao longo da vida, além de subdesenvolvimento em relação aos contemporâneos desde o nascimento, atingindo 200 kg de peso vivo aos 12 meses. O Bovino 2 (Fazenda A), apresentou emaciação acentuada, com episódios intermitentes de pneumonia, para os quais, muitas vezes, não havia resolução completa, bem como episódios de tristeza parasitária bovina. Esse animal demonstrou, ainda, subdesenvolvimento corporal, com aproximadamente 300 kg de peso vivo aos 24 meses de idade. O Bovino 3 (Fazenda B), também apresentou quadros recorrentes de pneumonia e subdesenvolvimento corporal, com peso estimado em 150 kg aos oito meses de idade. Devido às doenças recorrentes, os animais eram frequentemente expostos à terapia medicamentosa, sendo os antimicrobianos mais frequentemente utilizados à base de penicilina, oxitetraciclina e florfenicol.

Os três bovinos apresentaram alterações em todos os analitos séricos mensurados (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis séricos de analitos relacionados à função renal em bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV.

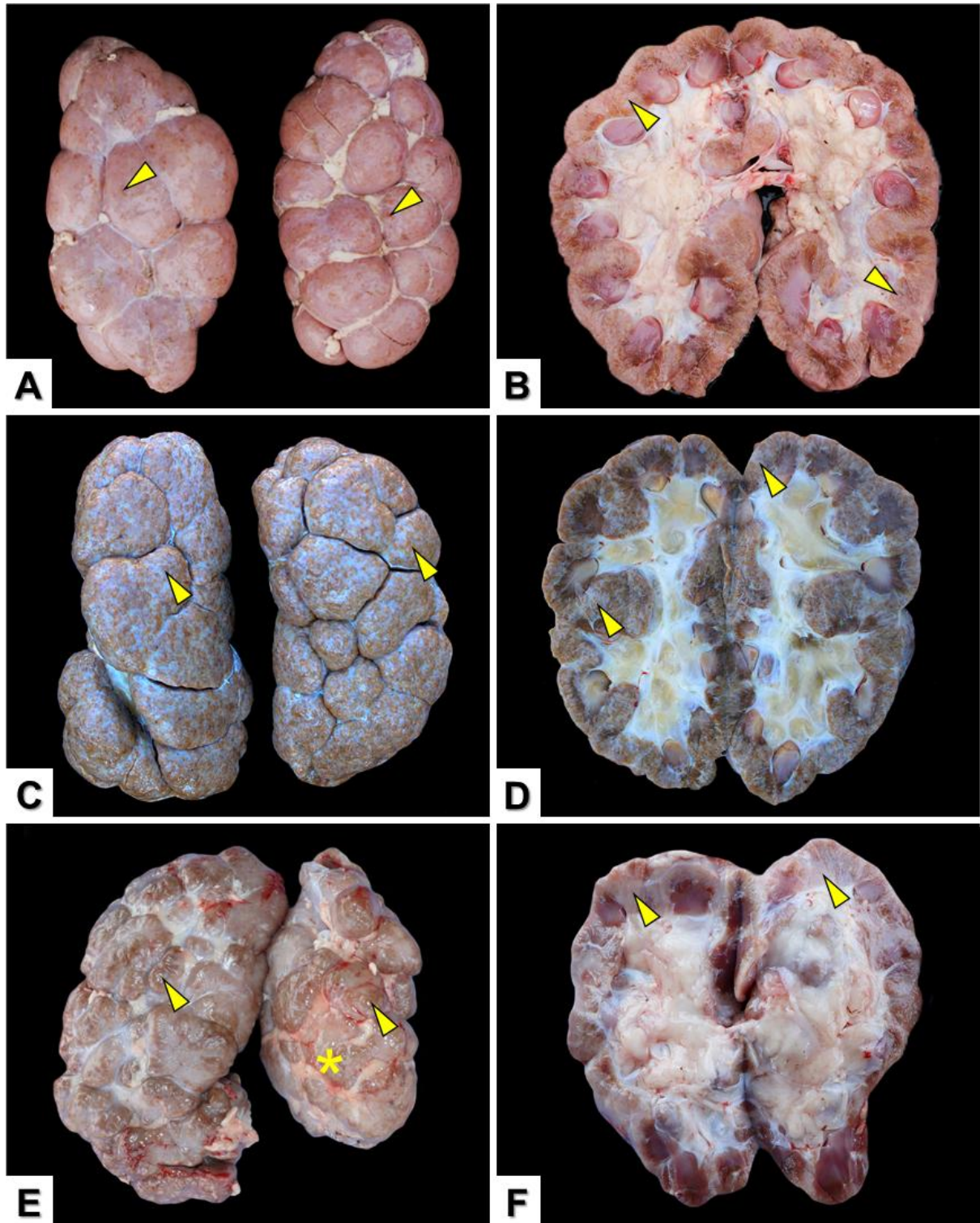
Analito	Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Valor de referência*
Ureia (mg/dL)	387,0	375,0	258,0	42,8 - 64,2
Creatinina (mg/dL)	6,2	6,1	4,3	1,0 - 2,0
Albumina (g/dL)	1,0	1,0	2,0	3,0 - 3,6
Proteína total (g/dL)	4,0	4,3	5,4	6,7 - 7,5

*Braun & Lefebvre, 2008

Elaborada pelo autor, 2026.

À necropsia, observou-se nos três bovinos estado corporal magro e mucosas pálidas. Nos Bovino 1 e 3, os cascos de todos os membros demonstravam crescimento excessivo e irregular. Ainda no Bovino 3, havia hipotricose em região glútea esquerda. Todos os bovinos apresentavam edema subcutâneo multifocal em região abdominal, variando de discreto a moderado. Os três bovinos apresentaram lesões renais semelhantes: no Bovino 1, os rins estavam moderadamente diminuídos, firmes e esbranquiçados, com áreas multifocais a coalescente moderadas de retração do parênquima, entremeadas a nodulações parenquimatosas multifocais discretas, que variavam de 0,1 a 0,5 cm em superfície capsular (Figura 1A). As regiões cortical e medular apresentavam coloração heterogênea variando de castanho a esbranquiçado (Figura 1B). No Bovino 2, os rins estavam moderadamente diminuídos e esbranquiçados, com retração do parênquima multifocal a coalescente acentuada, entremeada a nodulações parenquimatosas multifocais a coalescente acentuadas de 0,1 a 0,3 cm (Figura 1A). No córtex havia estriações esbranquiçadas multifocais moderadas (Figura 1D). No Bovino 3, o rim direito apresentava-se moderadamente diminuído em relação ao contralateral (Figura 1E), ambos moderadamente esbranquiçados, com retração multifocal acentuada do parênquima, entremeada a nodulações parenquimatosas multifocais acentuadas de 0,5 a 1 cm. No córtex havia áreas esbranquiçadas multifocais acentuadas em rim direito (Figura 1F) e multifocais moderadas em rim esquerdo.

Figura 1. Lesões macroscópicas em rins de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Bovino 1:** rins moderadamente diminuídos, firmes e esbranquiçados, com áreas de retração do parênquima, entremeadas a nodulações parenquimatosas que variavam de 0,1 a 0,5 cm em superfície capsular (setas). **B – Bovino 1:** região cortical e medular com áreas de coloração heterogênea variando de castanho a esbranquiçado (setas). **C – Bovino 2:** rins acentuadamente diminuídos e esbranquiçados, com retração do parênquima, entremeada a nodulações parenquimatosas de 0,1 a 0,3 cm (setas). **D – Bovino 2:** em corte dorsal, estriações esbranquiçadas em região cortical (setas). **E – Bovino 3:** rins moderadamente esbranquiçados, com retração do parênquima, entremeada a nodulações parenquimatosas de 0,5 a 1 cm (setas); rim direito moderadamente diminuído em relação ao contralateral (asterisco). **F – Bovino 3:** em corte dorsal, áreas esbranquiçadas (seta) em rim direito.

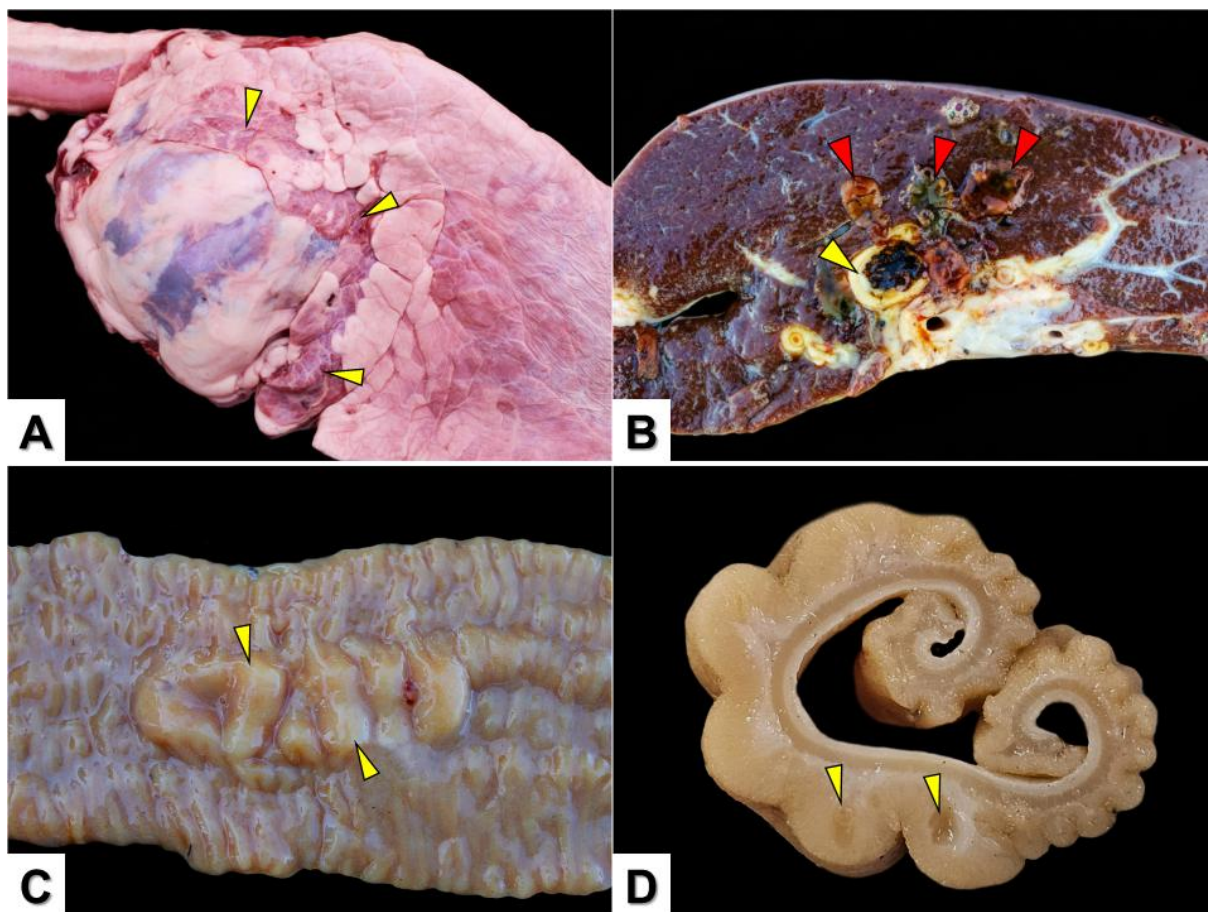


Fonte: arquivo pessoal

Em cavidade torácica do Bovino 1, havia áreas de aderências multifocais moderadas entre a pleura visceral e parietal, além de área focalmente extensa moderada avermelhada e consolidada do parênquima pulmonar na região anteroventral acometendo cerca de 50% do lobo cranial esquerdo (Figura 2A) e 30% do lobo cranial direito. No Bovino 2, em pulmões, havia áreas multifocais discretas de consolidação do parênquima, também em região anteroventral, mas acometendo cerca de 10% lobo cranial direito, além de aderências entre a pleura visceral e parietal multifocais moderadas.

Adicionalmente, no Bovino 2 em fígado, observou-se áreas multifocais discretas esbranquiçadas e retraídas em superfície capsular. Ao corte, havia distensão e espessamento multifocais moderados de ductos biliares, no lúmen dos quais encontrou-se bile espessa, detritos e moderada quantidade exemplares adultos de *Fasciola hepatica* (Figura 2B). Em abomaso, havia edema de submucosa multifocal moderado. Nos Bovinos 1 e 2, observou-se placas de Peyer de jejuno e íleo evidentes e aumentadas (Figura 2C) que, por vezes, apresentavam, ao corte, cavitações de até 0,5 cm (Figura 2D). No Bovino 2, na transição entre cólon e ceco, havia nodulações multifocais a coalescente na mucosa medindo de 0,2 a 0,5 cm de diâmetro, circunscritas, discretamente elevadas e de superfície lisa.

Figura 2. Lesões macroscópicas secundárias em bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Pulmão (Bov. 1):** área de consolidação do parênquima pulmonar na região anteroventral acometendo cerca de 50% do lobo cranial esquerdo. **B – Fígado (Bov. 2):** ducto biliar ectásico e com paredes espessadas (seta amarela), com exemplares adultos de *Fasciola hepatica* (setas vermelhas). **C – Íleo (Bov. 2):** placa de Peyer evidente e aumentada (setas). **D – Íleo (Bov. 2):** placas de Peyer, em corte transversal, cavitações de até 0,5 cm (setas).

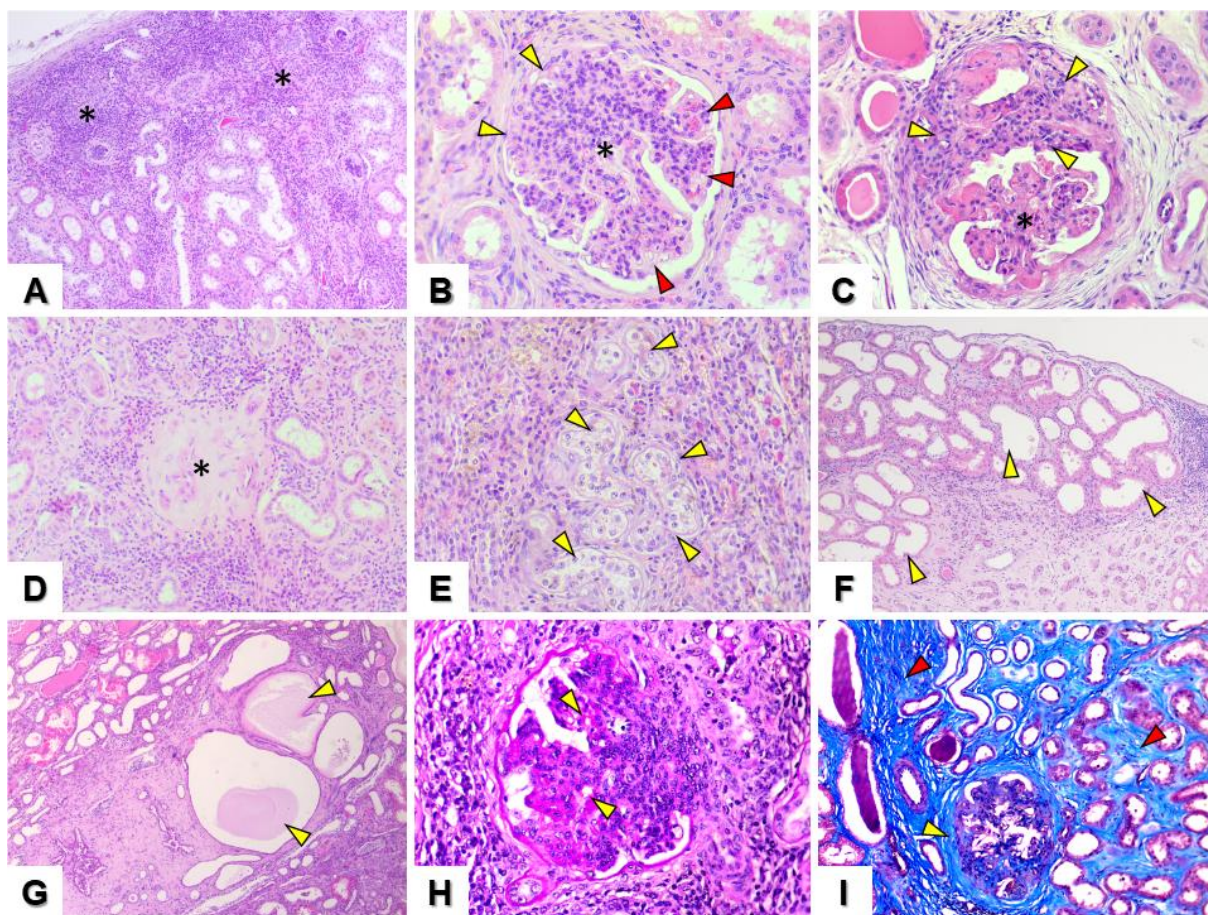


Fonte: arquivo pessoal

As alterações histológicas renais nos três bovinos foram caracterizadas por retração do parênquima, acompanhada por proliferação de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado linfoplasmocítico intersticial, multifocal a coalescente acentuados, configurando nefrite intersticial linfoplasmocítica fibrosante multifocal acentuada, crônica (Figura 3A). As lesões glomerulares foram representadas por segmentação dos tufo glomerulares, que adotaram um aspecto “folha de trevo”, acompanhada por proliferação de células mesangiais e espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares bem como aderência segmentar do tufo glomerular ao folheto parietal da cápsula de Bowman (Figura 3B) que, por vezes, apresentava-se espessada e hialinizada. Alguns glomérulos apresentaram colapso segmentar dos tufo capilares, acompanhado por hiperplasia das células epiteliais parietais e infiltração de células macrófagos, linfócitos e plasmócitos no espaço de Bowman, formando estruturas semelhantes a pseudocrescentes (Figura 3C). Outras lesões glomerulares incluíram

hialinização (Figura 3D) e fibrose periglomerular. Morfologicamente as lesões glomerulares foram predominantemente classificadas em glomerulonefrite membranoproliferativa multifocal moderada (Bov. 3) a acentuada (Bov. 1 e 2), crônica. Os túbulos renais de todos os animais apresentaram atrofia tubular (Figura 3E) acompanhada por hipertrofia e dilatação de túbulos remanescentes (Figura 3F), multifocais variando de moderadas (Bov. 3) a acentuadas (Bov. 1 e 2). Observou-se, ainda, dilatação tubular e acúmulo de gotas e cilindros hialinos (Figura 3G). A técnica histoquímica de Periódico Acid–Schiff (PAS) evidenciou espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares em todos os bovinos (Figura 3H). A fibrose intersticial e periglomerular foi evidenciada pela técnica de Tricrômico de Masson, exibindo azul intenso (Figura 3I) em todos os bovinos. A técnica de Vermelho Congo apresentou marcação negativa em todos os bovinos.

Figura 3. Lesões histológicas observadas em rins de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Bov. 1:** fibrose intersticial acompanhada por infiltrado linfoplasmocítico (asteriscos). **B – Bov. 2:** segmentação glomerular (setas vermelhas) acompanhada por proliferação de células mesangiais (asterisco) e aderência do tufo glomerular ao folheto parietal da cápsula de Bowman (setas amarelas). **C – Bov. 2:** colapso segmentar do tufo glomerular (asterisco), com formação de pseudocrescente (setas). **D – Bov. 1:** glomérulo completamente hialinizado (asterisco). **E – Bov. 3:** múltiplos túbulos renais atróficos (setas). **F – Bov. 2:** hipertrofia de túbulos renais remanescentes (setas). **G – Bov. 2:** dilatação tubular e acúmulo de gotas e cilindros hialinos (setas). **H – Bov. 2:** espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares evidenciados pela técnica Periodic Acid–Schiff – PAS (setas). **I – Bov. 3:** fibrose intersticial (setas vermelhas) e periglomerular (seta amarela) demonstrada pela técnica Tricrômico de Masson.



Fonte: arquivo pessoal

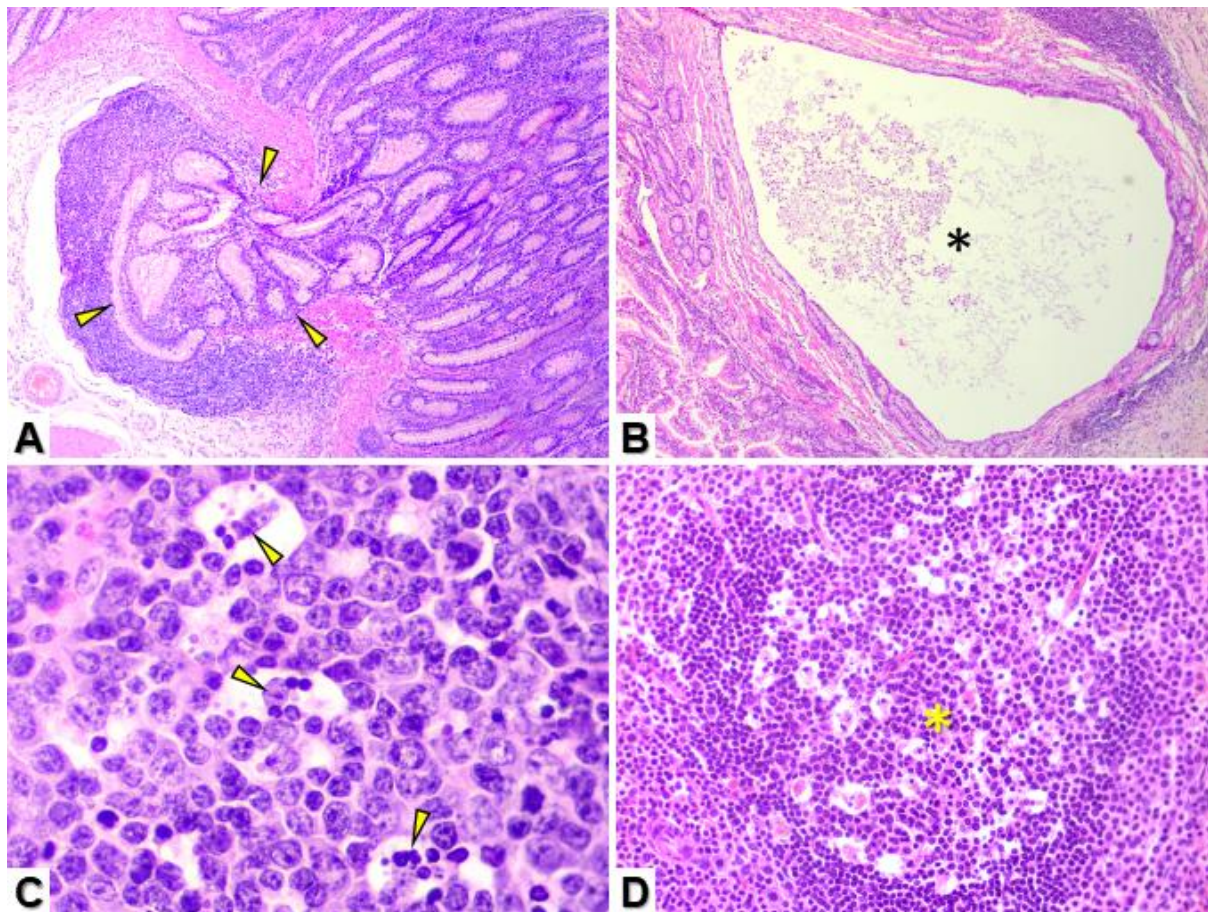
Em pulmões do Bovino 1, havia infiltrado de neutrófilos, além de macrófagos, linfócitos e plasmócitos no lúmen de alvéolos brônquios e bronquíolos, além fibrose, configurando broncopneumonia supurativa fibrosante multifocal moderada, crônico ativa. Em pleura, havia proliferação de tecido conjuntivo fibroso, acompanhada por infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, sendo morfologicamente compatível como pleurite fibrosante multifocal moderada, crônico ativa. Havia, ainda, hiperplasia de tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), no qual observou-se apoptose de linfócitos, multifocais moderadas. Em pulmões do Bovino 2, havia infiltrado de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos no lúmen de alvéolos e brônquios, além fibrose, configurando broncopneumonia supurativa fibrosante multifocal discreta,

crônico ativa. Já em fígado, observou-se hiperplasia de ductos biliares que, apresentaram proliferação de tecido conjuntivo fibroso em paredes ductais. Os ductos estavam ectásicos, repletos de conteúdo particulado de aspecto arenoso, bem como exemplares de *Falsciola hepatica*. Havia também proliferação de tecido conjuntivo fibroso periductal e portal, acompanhado por infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, multifocais acentuados. Por fim, as lesões hepáticas foram classificadas como colângio-hepatite hiperplásica e fibrosante multifocal moderada.

A análise histopatológica de jejuno e íleo dos Bovinos 1 e 2, constatou-se em placas de Peyer, substituição parcial ou completa dos folículos por criptas intestinais herniadas através da submucosa (Figura 4A). Além disso, alguns folículos foram substituídos por cavidades revestidas por epitélio achatado, contendo muco, restos necróticos e infiltrado de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Figura 4B).

No Bovino 2, na transição entre cólon e ceco observou-se o mesmo padrão histológico observado nas placas de Peyer de jejuno e íleo, marcado por depleção linfoide multifocal acentuada, formação de cavitações e herniação de criptas intestinais, multifocais moderadas. No Bovino 3, em placas de Peyer, havia apoptose de linfócitos multifocal moderada (Figura 4D), caracterizada por picnose, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos livres e fagocitados por macrófagos de corpo tingível, com raros folículos completamente depletados e invadidos por criptas herniadas. Em todos os bovinos havia em linfonodos e baço, apoptose de linfócitos multifocal moderada (Figura 4D).

Figura 4. Lesões histológicas em tecidos linfoides de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Jejuno (Bov. 1):** substituição parcial de folículo linfoide de placa de Peyer por criptas intestinais herniadas através da submucosa (setas). **B – Íleo (Bov. 2):** folículo linfoide substituído por cavidade revestida por epitélio pavimentoso, contendo muco, restos necróticos e infiltrado de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (asterisco). **C – Placa de Peyer (Bov. 3):** formação de corpos apoptóticos livres e fagocitados por macrófagos de corpo tingível (setas). **D – Baço (Bov. 1):** apoptose de linfócitos em folículo linfoide (asterisco).



Fonte: arquivo pessoal

1.3.2 Análise Molecular, Sequenciamento e Análise Filogenética

Amostras de soro e rins dos três bovinos foram positivas para o BVDV na RT-PCR. A análise das sequências de nucleotídeos obtidas pelo sequenciamento genético das amostras demonstrou 100% de identidade entre os isolados dos Bovinos 1 (PV990129.1 - UDESC/14/2025) e 2 (PX021435.1 - UDESC/15/2025), da Fazenda A, enquanto ambas apresentaram cerca de 98% de similaridade com o isolado do Bovino 3 (PV982290.1 - UDESC/13/2025), da Fazenda B. Os três isolados foram classificados como BVDV-1a, apresentando alta identidade genética que variou entre 98,3% e 100% com isolados da América do Sul, América do Norte e África pertencentes ao subgenótipo 1a. A comparação com isolados brasileiros demonstrou níveis de similaridade entre 94,4 e 95,3% com duas sequências do Rio Grande do Sul. A semelhança com as duas únicas sequências do BVDV-1a já detectadas em Santa Catarina mostrou-se ainda mais baixa, com índices variando de 89,3 a 93,3%. A PCR

A árvore filogenética gerada utilizando sequências de cepas referência de diferentes espécies e subgenótipos de pestivírus, bem como cepas do BVDV de alta similaridade com os isolados deste estudo, distribuiu as cepas em três ramos distintos (Figura 5). Um dos ramos correspondeu ao *Pestivirus bovis* (BVDV-1), no qual foram alocadas as sequências isoladas dos bovinos deste estudo. Elas em um clado comum e bem delimitado, com relação monofilética evidente com sequências do BVDV-1a da Argentina, Estados Unidos, Canadá e Moçambique. Com relação às sequências Brasileiras, verificou-se maior distanciamento evolutivo, com ancestral mais antigo se comparadas às sequências deste estudo. Os outros ramos corresponderam ao *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus giraffae* (GPev).

Phylogenetic tree showing the relationships between BVDV-1 and BVDV-2 isolates. The tree is rooted at the bottom left. The scale bar represents 0.25 substitutions per site.

BVDV-1 (Pestivirus bovis):

- AF049221.2 Bega
- AB300674.1 AQMZ96BII1/1
- PV982290.1 UDESC/13/2025
- AF091605.1 Oregon C24V
- AF244958.1 318
- AF244960.1 65.2
- FM165312.1 buffalo 17
- L32876.1 C3
- U97412.1 M099B/93
- PX990129.1 UDESC/14/2025
- PX021435.1 UDESC/15/2025
- AF298056.1 16-111
- AF298065.1 F-Austria
- JX065783.1 HJ-1
- M96687.1 Osloss
- AF298067.1 J-Austria
- AF298073.1 W-Austria
- KF205276.1 21-07
- LT901611.1 MRI1232
- AF298069.1 L-Austria
- EU224236.1 B434/06

BVDV-2 (Pestivirus tauri):

- AF502399.1 New York 93
- MH231143.1 RS886
- AB003621.1 OY89
- AB019688.1 MS-1
- AY379547.1 Giessen 6
- U94914.1 Soldan

BVDV-2 (Pestivirus giraffae):

- KJ660072.1 PG-2

84

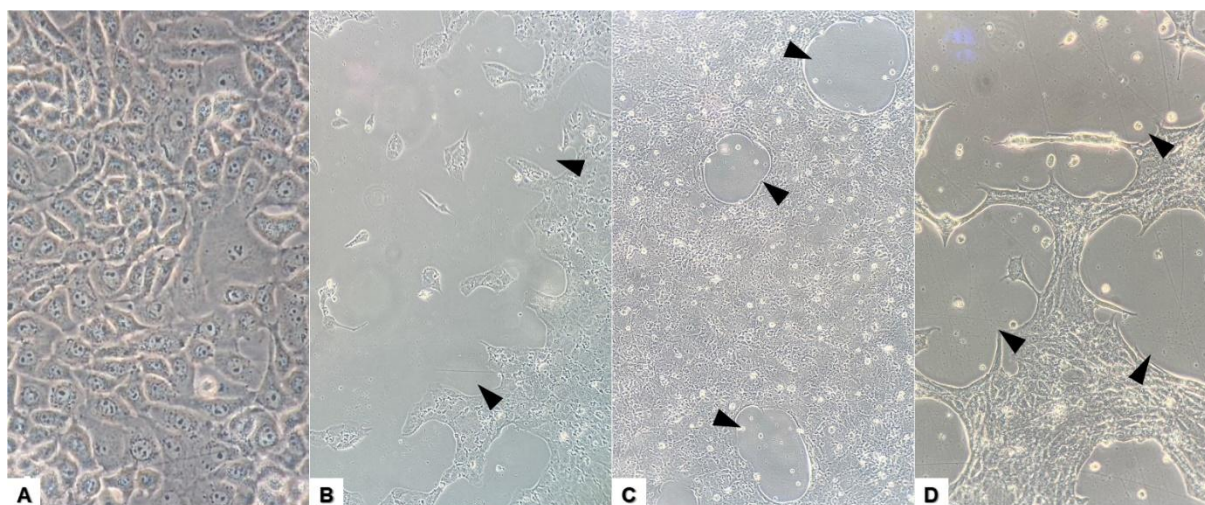
1.3.3 Cultivo e Isolamento Viral

As garrafas dos Bovinos 1, 2 e 3 foram avaliadas em conjunto com a garrafa controle, composta por um tapete celular uniforme (Figura 6A). Nas células inoculadas com amostras do Bovino 1, observou-se crescimento celular normal nas primeiras 48h pós-inoculação. No terceiro dia (72h), surgiram pequenas áreas de lise celular, compatíveis com o início da formação de placas. Em 96h, verificou-se aumento da celularidade nas placas pré-existentes e o aparecimento de novas formações. No quinto dia (120h), as placas apresentaram um aumento progressivo (Figura 6B). Após a troca de meio, houve discreta redução das placas, que persistiram até 168h, com posterior diminuição de tamanho e efeito citopático em 192 horas, indicando redução da atividade viral após a remoção do sobrenadante.

Nas células inoculadas com as amostras do Bovino 2, observou-se crescimento celular normal nas primeiras 48h pós-inoculação. No terceiro dia (72h), surgiram placas em pequenas regiões da garrafa (Figura 6C). Em 96 horas, as placas aumentaram em tamanho e foram observadas novas formações. No quinto dia (120h), manteve-se o padrão de placas, sem progressão significativa. Após a troca de meio, observou-se descolamento parcial do tapete celular e diminuição das placas. Entre 144 e 192h, as células apresentaram crescimento normal, sem novas alterações morfológicas e efeito citopático, indicando redução da atividade viral após a remoção do sobrenadante.

Nas células inoculadas com as amostras do Bovino 3, observou-se crescimento celular normal nas primeiras 48 horas pós-inoculação. No terceiro dia (72h), surgiram pequenas placas na região inferior do frasco. Em 96h, as placas aumentaram em tamanho e novas formações médias foram observadas no cultivo celular (Figura 6D). No quinto dia (120h), notou-se discreta diminuição do número e tamanho das placas, embora ainda presentes. Após a troca de meio, houve redução parcial das formações de efeito citopático, seguida do aparecimento de uma nova placa de grande extensão aos sete dias de incubação, mantendo-se estável até 192 horas, indicando redução da atividade viral após a remoção do sobrenadante.

Figura 6. Cultivo celular e isolamento viral em células MDBK com amostras de bovinos com síndrome nefrótica associada ao BVDV. **A – Cultivo controle:** tapete celular íntegro. **B - Bovino 1:** placas celulares (setas) em aumento progressivo às 120h pós-inoculação. **C – Bovino 2:** surgimento de placas (setas) em pequenas regiões da garrafa às 72h pós-inoculação. **D – Bovino 3:** placas em aumento progressivo (setas) às 96h pós-inoculação.



Fonte: arquivo pessoal

1.4 DISCUSSÃO

Descrições de síndrome nefrótica associada à infecção pelo BVDV são escassas (WHITE et al., 1986; TRANG et al., 2014), visto que a condição é pouco comum em bovinos e raramente foi atribuída a glomerulopatias (MURRAY & SHARPE, 2009). A síndrome foi inicialmente associada ao vírus e à glomerulonefrite em uma vaca de três anos, que apresentou características semelhantes às observadas nestes bovinos, como subdesenvolvimento evidente e desenvolvimento de doença clínica progressiva e grave (WHITE et al., 1986). O mesmo quadro ocorreu em um bezerro de dois meses infectado pelo BVDV, com histórico de baixo crescimento, edema generalizado, colaborando com quadro encontrado no Bovino 3, que também desenvolveu doença crônica mesmo com pouca idade (TRANG et al., 2014).

Os resultados obtidos pela análise bioquímica sérica dos três bovinos foram caracterizados por hipoalbuminemia, hipoproteinemia, além de hiperuremia e aumento de creatinina, sendo semelhantes (TRANG et al., 2014) ou mais graves (WHITE et al., 1986) do que o observado em episódios de síndrome nefrótica associada ao BVDV. Esses achados estão relacionados à lesão glomerular, que impede a correta filtração sanguínea e favorece o acúmulo de compostos nitrogenados no sangue, bem como proteinúria (BROWN et al., 2016), demonstrada histologicamente nestes casos pelo acúmulo de material amorfo e eosinofílico no lúmen tubular. Dessa forma, a falha renal resulta em sinais clínicos como edema

generalizado e emaciação, conforme observado em maior ou menor grau nos três bovinos deste estudo (MURRAY & SHARPE, 2009; TRANG et al., 2014; WHITE et al., 1986; WISEMAN et al., 1980).

Em casos de síndrome nefrótica atribuídos ao BVDV, os rins apresentavam-se discretamente pálidos, de tamanho normal ou aumentados, com focos diminutos, avermelhados e brilhantes, distribuídos por toda a superfície cortical, compatíveis com glomerulopatias (TRANG et al., 2014; WHITE et al., 1986). No entanto, as lesões macroscópicas observadas neste estudo assemelham-se apenas parcialmente às previamente descritas. A macroscopia caracterizada por retração do parênquima e estriações esbranquiçadas na cortical demonstrou características tipicamente observadas na doença renal crônica (BROWN et al., 2016).

O mecanismo de desenvolvimento das lesões macroscópicas está relacionado à a glomerulonefrite membranoproliferativa observada nos três bovinos, a qual foi descrita em bovinos infectados pelo BVDV de forma isolada ou associada a lesões intersticiais (CUTLIP et al., 1980; HEWICKER et al., 1987; PRAGER & LIESS, 1976; TRANG et al., 2014). Esse padrão de glomerulonefrite fundamenta-se na deposição de imunocomplexos nos capilares glomerulares, a qual foi evidenciada pelo espessamento da membrana basal pela técnica de PAS (MCLELAND et al., 2015). A progressão da doença resulta em um processo degenerativo nos glomérulos, caracterizado por aderências, espessamento capsular e hialinização, os quais foram observadas histologicamente (WHITE et al., 1986). A morte glomerular leva a perda dos néfrons, os quais são substituídos por fibrose (BROWN et al., 2016). Esse componente lesional foi demonstrado pela técnica Tricrômico de Masson nestes casos, que acompanhado por processos inflamatórios, resultou na aparência macroscópicas esbranquiçada e retraída destes rins (MCLELAND et al., 2015).

O desenvolvimento de uma glomerulonefrite imunomediada nestes bovinos pode estar relacionado à infecção persistente pelo BVDV, sugerida nestes animais pela presença de cepas citopáticas, debilidade clínica e subdesenvolvimento corporal (WALZ et al., 2020). A imunossupressão característica do vírus, somada às coinfeções observadas, como a fasciolose e os quadros respiratórios crônicos e redicivantes nos Bovinos 1 e 2, resultam em uma antigenemia persistente e interações antígeno-anticorpo prolongadas, ocasionando o dano glomerular observado (TIETZ MARQUES et al., 2004; GAUDINO et al., 2022).

A depleção linfóide caracterizada por apoptose massiva de linfócitos em placas de Peyer e demais órgãos linfóides foi observada, a qual é tipicamente associada ao BVDV (TEICHMANN et al., 2000). Ao extrapolar efeito similar a outras doenças, como o Lúpus eritematoso, um mecanismo conhecido como necrose secundária ocorre quando há sobrecarga apoptótica, que excede a capacidade dos fagócitos no local, levando a produção de autoantígenos, os quais são importantes mediadores da glomerulonefrite (KAPLAN, 2004). Adicionalmente, o RNA viral foi detectado nos rins por RT-PCR, o que permite efeito direto nos glomérulos, bem como a formação de imunocomplexos *in situ* (HEWICKER et al., 1987).

Diagnósticos diferenciais devem ser considerados diante de algumas lesões observadas nestes bovinos. Pneumonia, nefrite intersticial, glomerulonefrite, bem como apoptose de linfócitos e placas de Peyer aumentadas, podem ser observadas em infecções pelo *Gammaherpesvirus 2* (OvHV-2), em casos de Febre Catarral Maligna. Entretanto, além da PCR negativa, lesões anatomopatológicas típicas da infecção, opacidade de córnea, erosões e ulcerações em tegumento e trato digestório, bem como vasculite disseminada não foram observadas (HEADLEY et al., 2021). Além disso, a amiloidose não foi detectada nos rins destes bovinos pela técnica de vermelho congo, mas é um importante diferencial em episódios de glomerulonefrites, principalmente quando há lesões hialinizantes, principalmente por se tratar a principal causa de síndrome nefrótica em bovinos (ELITOK et al., 2008).

Com relação à filogenia, a elevada identidade entre as sequências do BVDV-1a provenientes dos Bovinos 1 e 2 (Fazenda A) é consistente com a dinâmica de transmissão intra-rebanho, indicando a circulação de uma cepa viral comum (MARIAN et al., 2025). Embora tais sequências não apresentem 100% de similaridade com o isolado do Bovino 3 (Fazenda B) a proximidade filogenética e o compartilhamento do mesmo cluster entre sequências obtidas de regiões relativamente próximas é um indicativo de disseminação regional/estadual do vírus, principalmente quando há trânsito animal frequente entre as propriedades (QI et al., 2019). Contudo, visto que ambas as fazendas possuem rebanhos fechados há anos, a introdução do BVDV via animais de reposição torna-se improvável. Dessa forma, falhas de biossegurança ganham relevância e a transmissão indireta por meio de fômites torna-se mais provável, principalmente no que se refere a veículos transportadores, veterinários e trabalhadores contaminados que eventualmente se deslocam entre múltiplas fazendas em um único dia (RANA et al., 2025a).

A análise filogenética revelou que os isolados detectados neste estudo possuem similaridade superior a 99% com sequências de Moçambique, associadas a quadros entéricos (BAULE et al., 1997) e com cepas argentinas provenientes de búfalos assintomáticos, bovinos e soro fetal (CRAIG et al., 2015; JONES et al., 2001). Tais sequências demonstram alta semelhança com isolados norte-americanos, alcançando até 100% de identidade com cepas dos EUA, como a vacinal Oregon C24V e a 11957c, vinculada a surtos de alta mortalidade (HOLTHAUSEN et al., 2025), além do isolado canadense C3, oriundo de casos de doença das mucosas (PELLERIN et al., 1994). As fronteiras terrestres sul-americanas atuam como facilitadores dessa dinâmica, permitindo a importação de bovinos, o trânsito de material biológico e a migração de espécies silvestres carreadoras do vírus (RANA et al., 2025; SOSA et al., 2025).

Ambos os animais deste estudo eram provenientes de rebanhos vacinados com vacinas inativadas que possuem cepas do BVDV-1a nas formulações (SILVA et al., 2021). A circulação viral e a ocorrência de animais PI são fenômenos relatados em rebanhos submetidos à vacinação contínua, embora os subtipos de campo frequentemente sejam diferentes daqueles contidos nos imunizantes (ANTOS et al., 2021; FRITZEN et al., 2024). O uso de vacinas inativadas é capaz de promover ampla proteção contra a infecção fetal quando as cepas vacinais e de campo pertencem ao mesmo subgenótipo (PATEL et al., 2002), tal eficácia não foi observada no presente estudo. Diversos fatores podem estar associados à manutenção do vírus nestes rebanhos, mesmo com a adoção da vacinação regular e reposição própria.

O controle do BVDV envolve primariamente a detecção e eliminação de animais PI, aliada a medidas de biossegurança e utilização de vacinas eficazes (FULTON et al., 2020). É possível que os isolados destes casos possuam disparidade antigênica em relação aos contidos nas vacinas utilizadas, uma vez que variações nos títulos de anticorpos neutralizantes já foram relatadas mesmo dentro de um mesmo subgenótipo (NEILL et al., 2019). Finalmente, falhas na manipulação e armazenamento dos imunizantes não podem ser desprezadas, os quais requerem cuidados específicos para manutenção da integridade e eficácia (ANTOS et al., 2021).

O cultivo de células MDBK inoculadas com as amostras dos três bovinos revelou alterações citopatogênicas típicas, marcadas por intensa vacuolização do citoplasma, com a formação de vacúolos que exibiam tendência à coalescência, originando estruturas de maiores dimensões (BIRK et al. 2008; HAO et al., 2025; RANA et al., 2025b). Em todos os bovinos, o efeito citopático pleno, caracterizado por

formações vacuolizações e placas celulares, ocorreu entre às 72 e 96h pós-inoculação, mostrando-se semelhante morfológica e cronologicamente ao observado em cepas de campo do BVDV isoladas de bovinos leiteiros (RANA et al., 2025b). Esses resultados podem estar relacionados ao nível de virulência das cepas (HAO et al., 2025), visto que cepas altamente virulentas tendem a apresentar efeitos citopático precocemente em cultivo celular (BIRK et al., 2008). Entretanto, análises adicionais são necessárias para definir níveis de virulência das cepas do BVDV destes bovinos.

Algumas limitações deste estudo devem ser consideradas. A aplicação de métodos diagnósticos complementares para a localização *in situ* do vírus, como a imuno-histoquímica (IHQ) (BIANCHI et al., 2017) e a hibridização *in situ* (ISH) (HEIDARI et al., 2021) não foi possível devido à limitada disponibilidade no Brasil. Ambas as técnicas seriam fundamentais para correlacionar o antígeno viral às lesões histológicas observadas. Adicionalmente, a utilização da imunofluorescência permitiria confirmar a deposição de imunocomplexos nos capilares glomerulares (TRANG et al., 2014), achado sugerido pelo espessamento de membrana basal evidenciado na coloração de PAS, auxiliando na compreensão da patogenia das lesões renais encontradas nos bovinos deste estudo.

1.5 CONCLUSÃO

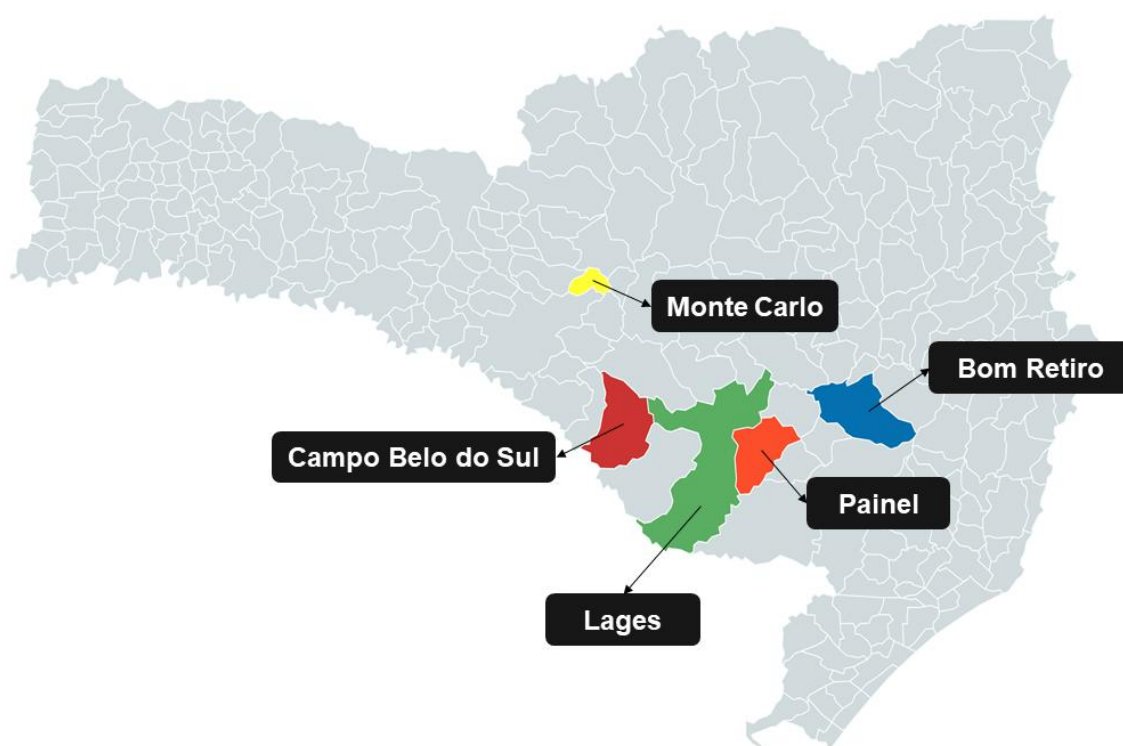
Este estudo caracterizou três episódios raros na literatura mundial de síndrome nefrótica associada a isolados citopáticos do BVDV. Os bovinos acometidos eram historicamente imunossuprimidos e frequentemente acometidos por infecções secundárias. Manifestações clínicas como edema, hipoproteinemia e proteinúria foram correlacionadas à glomerulonefrite membranoproliferativa associada à nefrite intersticial linfoplasmocítica e fibrosante. Por meio desses resultados, faz-se necessário incluir as doenças renais no espectro de manifestações patológicas associadas ao BVDV.

CAPÍTULO V

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A integração dos resultados obtidos na totalidade deste estudo permitiu uma caracterização abrangente dos aspectos clínicos, patológicos, virológicos, moleculares e filogenéticos envolvidos nas apresentações associadas ao BVDV em diferentes municípios do estado de Santa Catarina (Figura 1).

Figura 1. Municípios de Santa Catarina com ocorrência de bovinos acometidos por doenças associadas ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV).



Elaborada pelo autor, 2026.

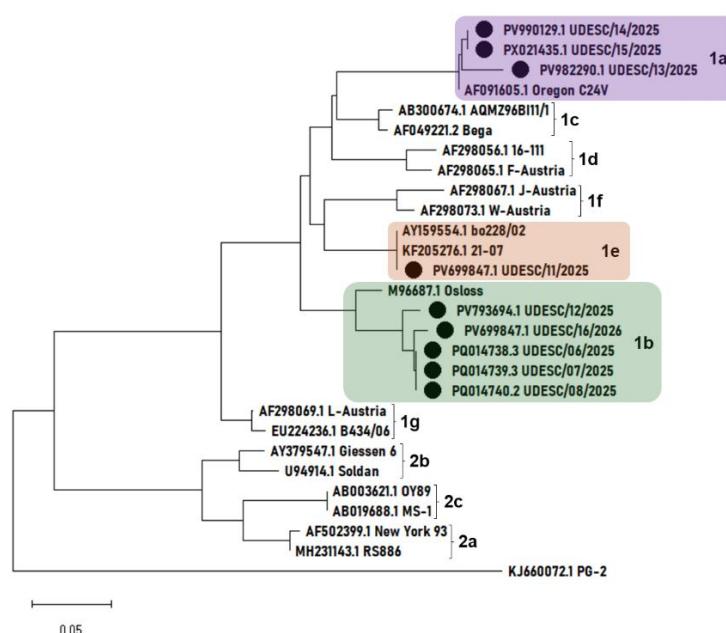
Até o início desta década, o BVDV jamais havia sido associado a doenças no estado (Silveira et al., 2017). Este estudo demonstrou a ocorrência de apresentações típicas da infecção viral, como abortamentos, malformações congênitas e doença das mucosas. Além disso, uma apresentação pouco comum e raramente relatada no mundo como a síndrome nefrótica (WHITE et al., 1986; TRANG et al., 2014) foi caracterizada em associação ao BVDV. Além disso, a detecção de cepas citopáticas na maioria dos casos analisados permitiu a melhor caracterização das enfermidades e demonstrou a ocorrência de diferentes biótipos em rebanhos do estado.

Com relação à caracterização filogenética, os dados demonstraram predomínio do BVDV-1 (*Pestivirus bovis*) no território catarinense, com a detecção do subgenótipos 1a, 1b e 1e (Fig. 2). Apesar do número de sequências obtidas neste

estudo não ser representativo o bastante para extrapolá-los ao restante do estado de Santa Catarina e determinar prevalência, são resultados que evidenciam a circulação viral ativa entre diferentes regiões e que fornecem dados para melhor compressão da dinâmica viral. Além disso, esses resultados podem servir de suporte para a implementação de medidas adicionais de biossegurança nas fazendas, além possibilitar o desenvolvimento de vacinas nacionais, a fim de melhorar a eficácia dos imunizantes atualmente disponíveis no mercado (SILVA et al., 2021).

Por fim, a caracterização das diferentes formas anatomopatológicas de apresentação do BVDV, bem como determinação dos biótipos, genótipos e subgenótipos envolvidos, devem servir de auxílio para a melhoria da abordagem diagnóstica a campo, além de promoverem a inserção do vírus entre os diagnósticos diferenciais de distúrbios reprodutivos, malformações congênitas, bem como doenças com acometimento dos sistemas tegumentar, digestivo e renal.

Figura 2. Árvore filogenética baseada na região 5'UTR do genoma viral dos pestivírus, utilizando todas as sequências de todos os bovinos infectados pelo BVDV detectados neste estudo, bem como sequências brasileiras e internacionais dos *Pestivirus bovis* (BVDV-1), *Pestivirus tauri* (BVDV-2) e *Pestivirus giraffae*, analisada pelo método *Maximum Likelihood* com 1000 *bootstraps* e modelo Kimura 2-parâmetros. As sequências detectadas neste estudo foram destacadas pelo símbolo distintivo (●).



Elaborada pelo autor, 2026.

2. REFERÊNCIAS

1. ABDELSALAM, K.; RAJPUT, M.; ELMOWALID, G. et al. The effect of bovine viral diarrhea virus (BVDV) strains and the corresponding infected macrophages' supernatant on macrophage inflammatory function and lymphocyte apoptosis. *Viruses*, v.12, n.7, p.701, 2020.
2. ALBRECHT, K.; LINDER, M.; HEINRICH, A. et al. Re-introduction of bovine viral diarrhea virus in a disease-free region: impact on the affected cattle herd and diagnostic implications. *Pathogens*, v.10, n.3, p.360, 2021.
3. AL-KUBATI, A. A.; HUSSEN, J.; KANDEEL, M. et al. Recent advances on the bovine viral diarrhea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.665128, 2021.
4. ALMEIDA, L. L.; MIRANDA, I. C. S.; HEIN, H. E. et al. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Research in Veterinary Science*, v.95, n.3, p.901–907, 2013.
5. ALPAY, G.; TOKER, E. B.; YEŞİLBAĞ, K. Persistent BVD virus infections in offspring from imported heifers. *Tropical Animal Health and Production*, v.51, p.297–302, 2019.
6. ALTAMIRANDA, E. G.; KAISER, G. G.; MUCCI, N. C. et al. 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.
7. ANTOS, A.; MIROSLAW, P.; ROLA, J. et al. Vaccination Failure in Eradication and Control Programs for Bovine Viral Diarrhea Infection. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.688911, 2021.
8. ASKARAVI, M.; REZATOFIGHI, S. E.; RASTEGARZADEH, S. et al. Development of a new method based on unmodified gold nanoparticles and peptide nucleic acids for detecting bovine viral diarrhea virus-RNA. *AMB Express*, v.7, p.1–9, 2017.
9. BACHOFEN, C.; BRAUN, U.; HILBE, M. et al. 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.
10. BASQUEIRA, N. S.; RAMOS, J. S.; TORRES, F. D. et al. An assessment of secondary clinical disease, milk production and quality, and the impact on reproduction in Holstein heifers and cows from a single large commercial herd persistently infected with bovine viral diarrhea virus type 2. *Viruses*, v.12, n.7, p.760, 2020.
11. BAULE, C.; VAN VUUREN, M.; LOWINGS, J. P. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Research*, v.52, n.2, p.205–220, 1997.

12. BAUMBACH, L. F.; MÓSENA, A. C. S.; ALVES, R. S. et al. HoBi-like pestivirus is highly prevalent in cattle herds in the Amazon Region (Northern Brazil). *Viruses*, v.15, n.2, p.453, 2023.
13. BAXTER, S. I. F.; POW, I.; BRIDGEN, A. et al. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Archives of Virology*, v.132, n.1–2, p.145–159, 1993.
14. BECHER, P.; ORLICH, M.; KOSMIDOU, A. et al. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, v.262, n.1, p.64–71, 1999.
15. BECKENHAUER, W. H.; BROWN, A. L.; LIDOLPH, A. A. et al. Immunization of swine against hog cholera with a bovine enterovirus, 1961.
16. BIANCHI, M. V.; KONRADT, G.; DE SOUZA, S. O. et al. Natural outbreak of BVDV-1d-induced mucosal disease lacking intestinal lesions. *Veterinary Pathology*, v.54, n.2, p.242–248, 2017.
17. BIANCHI, M. V.; SILVEIRA, S.; MÓSENA, A. C. S. et al. Pathological and virological features of skin lesions caused by BVDV in cattle. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.50, p.271–277, 2018.
18. BIRK, A. V.; DUBOVI, E. J.; COHEN-GOULD, L. et al. Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virus Research*, v.132, n.1–2, p.76–85, 2008.
19. BOLIN, S. R. The Pathogenesis of Mucosal Disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.11, n.3, p.489–500, 1995.
20. BOREL, N.; JANETT, F.; TEANKUM, K. et al. Testicular hypoplasia in a bull persistently infected with bovine diarrhoea virus. *Journal of Comparative Pathology*, v.137, n.2–3, p.169–173, 2007.
21. BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P. Kidney function and damage. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, p.485–528, 2008.
22. BRODERSEN, B. W. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology*, v.51, n.2, p.453–464, 2014.
23. BROWN, C. A.; ELLIOTT, J.; SCHMIEDT, C. W. et al. Chronic Kidney Disease in Aged Cats. *Veterinary Pathology*, v.53, n.2, p.309–326, 2016.
24. BRUSCHKE, C. J. M.; HAGHPARAST, A.; HOEK, A. et al. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.62, n.1, p.37–50, 1998.
25. CHASE, C. C. L. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals*, v.41, n.1, p.52–60, 2013.

26. CHENG, Z.; BROWN, L. E.; WATHES, D. C. Bovine viral diarrhoea virus infection disrupts uterine interferon stimulated gene regulatory pathways during pregnancy recognition in cows. *Viruses*, v.12, n.1, p.1, 2019.
27. CHERNICK, A.; AMBAGALA, A.; ORSEL, K. et al. Bovine viral diarrhea virus genomic variation within persistently infected cattle. *Infection, Genetics and Evolution*, v.58, p.218–223, 2018.
28. CHI, S.; CHEN, S.; JIA, W. et al. Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus. *Virus Genes*, v.58, n.6, p.491–500, 2022.
29. COLLINS, M. E.; HEANEY, J.; THOMAS, C. J. et al. Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. *Veterinary Microbiology*, v.138, n.3–4, p.289–296, 2009.
30. CORNISH, T. E.; VAN OLPHEN, A. L.; CAVENDER, J. L. et al. 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.
31. COSTA, L. S.; WITHOEFT, J. A.; BILICKI, J. V. et al. Neospora caninum-associated abortions in cattle from Southern Brazil: anatomopathological and molecular characterization. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v.36, p.100802, 2022.
32. CRAIG, M. I.; KÖNIG, G. A.; BENITEZ, D. F. et al. Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with bovine viral diarrhea viruses (BVDV) in serologically negative animals. *Revista Argentina de Microbiología*, v.47, n.2, p.148–151, 2015.
33. CRUZ, R. A. S.; RODRIGUES, W. B.; SILVEIRA, S. et al. Mucosal disease-like lesions caused by HoBi-like pestivirus in Brazilian calves in 2010–2011: clinical, pathological, immunohistochemical, and virological characterization. *Research in Veterinary Science*, v.119, p.116–121, 2018.
34. CUTLIP, R. C.; MCCLURKIN, A. W.; CORIA, M. F. Lesions in clinically healthy cattle persistently infected with the virus of bovine viral diarrhea—glomerulonephritis and encephalitis. *American Journal of Veterinary Research*, v.41, n.12, p.1938–1941, 1980.
35. DAMMAN, A.; VIET, A. F.; ARNOUX, S. et al. Modelling the spread of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in a beef cattle herd and its impact on herd productivity. *Veterinary Research*, v.46, p.1–14, 2015.
36. DARWEESH, M. F.; RAJPUT, M. K.; BRAUN, L. J. et al. Characterization of the cytopathic BVDV strains isolated from 13 mucosal disease cases arising in a cattle herd. *Virus Research*, v.195, p.141–147, 2015.

37. DECARO, N.; LANAVE, G.; LUCENTE, M. S. et al. Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by HoBi-like pestivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.52, n.8, p.2946–2954, 2014.
38. DEZEN, S.; OTONEL, R. A.; ALFIERI, A. F. et al. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p.141–147, 2013.
39. ELITOK, O. M.; ELITOK, B.; UNVER, O. Renal amyloidosis in cattle with inflammatory diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, n.2, p.450–455, 2008.
40. DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, v.41, n.1, p.8–13, 2013.
41. ESTEVES, P. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; PINTO, L. S. et al. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America. *Virus Research*, v.131, n.1, p.16–22, 2008.
42. EVANS, C. A.; PINIOR, B.; LARSKA, M. et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.66, n.2, p.640–652, 2019.
43. FAOSTAT. Rankings country by commodity. FAO, 2022.
44. FERREIRA, L. C.; FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D. et al. Mucosal disease associated with generalized dermatitis in cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, p.285–292, 2008.
45. FLORES, E. F.; CARGNELUTTI, J. F.; MONTEIRO, F. L. et al. A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998–2018). *Animal Health Research Reviews*, v.19, n.2, p.134–141, 2018.
46. FLORES, E. F.; GIL, L. H. V. G.; BOTTON, S. A. et al. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.77, n.1–2, p.175–183, 2000.
47. FOUNTAIN, J.; HERNANDEZ-JOVER, M.; KIRKEBY, C. et al. Modeling the effect of bovine viral diarrhea virus in Australian beef herds. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.795575, 2021.
48. FRAY, M. D.; MANN, G. E.; BLEACH, E. C. L. et al. Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, v.123, n.2, p.281–289, 2002.
49. FRITZEN, J. T. T.; ZUCOLOTO, N. Z.; LORENZETTI, E. et al. Outbreak of persistently infected heifer calves with bovine viral diarrhea virus subgenotypes 1b and 1d in a BVDV-vaccinated open dairy herd. *Acta Tropica*, v.254, p.107198, 2024.

50. FULTON, R. W.; COOK, B. J.; PAYTON, M. E. et al. Immune response to bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c. *Vaccine*, v.38, n.24, p.4032–4037, 2020.
51. GAETA, N. C.; RIBEIRO, B. L. M.; ALEMÁN, M. A. R. et al. Evaluation of bovine Parainfluenza type-3 virus and Influenza virus D participation in bovine respiratory disease of calves from Brazilian family farming. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v.11, n.4, p.227–232, 2017.
52. GAUDINO, M.; NAGAMINE, B.; DUCATEZ, M. F. et al. Understanding the mechanisms of viral and bacterial coinfections in bovine respiratory disease: a comprehensive literature review of experimental evidence. *Veterinary Research*, v.53, n.1, p.70, 2022.
53. GHASEMI MONJEZI, S.; REZATOFIGHI, S. E.; MIRZADEH, K. et al. Enzyme-free amplification and detection of bovine viral diarrhea virus RNA using hybridization chain reaction and gold nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.100, p.8913–8921, 2016.
54. GIAMMARIOLI, M.; CEGLIE, L.; ROSSI, E. et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes*, v.50, p.147–151, 2015.
55. GOTO, Y.; YAEHASHI, G.; FUKUNARI, K. et al. Clinical analysis for long-term sporadic bovine viral diarrhea transmitted by calves with an acute infection of bovine viral diarrhea virus 2. *Viruses*, v.13, n.4, p.621, 2021.
56. GOTTSCHALK, E. E.; GREISER-WILKE, I.; FREY, H. R. et al. An antigen capture test for the detection of cattle viremic with bovine viral diarrhoea virus: a comparison with BVD virus isolation from buffy coat cells in bovine kidney cells. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v.39, n.1–10, p.467–472, 1992.
57. GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.20, n.1, p.5–19, 2004.
58. GUO, T.; ZHANG, J.; CHEN, X. et al. Investigation of viral pathogens in cattle with bovine respiratory disease complex in Inner Mongolia, China. *Microbial Pathogenesis*, v.153, p.104594, 2021.
59. HANON, J. B.; VAN DER STEDE, Y.; ANTONISSEN, A. et al. Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhea (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, 2014.
60. HANSEN, T. R.; SMIRNOVA, N. P.; VAN CAMPEN, H. et al. Maternal and fetal response to fetal persistent infection with bovine viral diarrhea virus. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.64, n.4, p.295–306, 2010.

61. HAO, L.; ZHAO, F.; GUO, T. et al. Isolation, characterization and virulence assessment of Type 1d CP bovine viral diarrhea virus originating from Inner Mongolia, China. *Frontiers in Veterinary Science*, v.12, p.1554986, 2025.
62. HARMS, P. W.; FRANKEL, T. L.; MOUTAFI, M. et al. Multiplex immunohistochemistry and immunofluorescence: a practical update for pathologists. *Modern Pathology*, v.36, n.7, p.100197, 2023.
63. HEADLEY, S. A.; DE LEMOS, G. A. A.; DALL AGNOL, A. M. et al. Ovine gammaherpesvirus 2 infections in cattle without typical manifestations of sheep-associated malignant catarrhal fever and concomitantly infected with bovine coronavirus. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.53, n.1, p.433–446, 2021.
64. HEIDARI, Z.; REZATOFIGHI, S. E.; RASTEGARZADEH, S. Development and comparison of cross-linking and non-crosslinking probe-gold nanoparticle hybridization assays for direct detection of unamplified bovine viral diarrhea virus-RNA. *BMC Biotechnology*, v.21, n.1, p.30, 2021.
65. HESSMAN, B. E.; SJEKLOCHA, D. B.; FULTON, R. W. et al. Acute bovine viral diarrhea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.24, n.2, p.397–404, 2012.
66. HEWICKER, M.; TRAUTWEIN, G.; STAHL, C. et al. Kidney lesions in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v.34, n.1–10, p.1–12, 1987.
67. HILBE, M.; GIRAO, V.; BACHOFEN, C. et al. Apoptosis in bovine viral diarrhea virus-induced mucosal disease lesions: a histological, immunohistological, and virological investigation. *Veterinary Pathology*, v.50, n.1, p.46–55, 2013.
68. HILBE, M.; STALDER, H.; PETERHANS, E. et al. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhea virus infection in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, n.1, p.28–34, 2007.
69. HOCQUETTE, J. F.; ELLIES-OURY, M. P.; LHER, M. et al. Current situation and future prospects for beef production in Europe—A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v.31, n.7, p.1017, 2018.
70. HOLTHAUSEN, D. J.; BAYLES, D. O.; NEILL, J. D. et al. Deletion viral genome diversity among bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a and 1b strains. *Virology Journal*, v.22, n.1, p.237, 2025.
71. HORWOOD, P. F.; GRAVEL, J. L.; MAHONY, T. J. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *Journal of General Virology*, v.89, n.7, p.1643–1648, 2008.
72. HOU, P.; XU, Y.; WANG, H. et al. Detection of bovine viral diarrhea virus genotype 1 in aerosol by a real time RT-PCR assay. *BMC Veterinary Research*, v.16, p.1–9, 2020.

73. HUGUES, F.; CABEZAS, I.; GARIGLIANY, M. et al. First report of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes 1d and 1e in southern Chile. *Virology Journal*, v.20, n.1, p.205, 2023.
74. HURTADO, A.; GARCÍA-PÉREZ, A. L.; ADURIZ, G. et al. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Research*, v.92, n.1, p.67–73, 2003.
75. IBGE. Rebanho de bovinos (bois e vacas). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2023.
76. ICTV. Gênero: Pestivirus. Taxonomia de vírus. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021.
77. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). ICTV Code. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2023.
78. JONES, L. R.; ZANDOMENI, R.; WEBER, E. L. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*, v.81, n.4, p.367–375, 2001.
79. KAPLAN, M. J. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, v.112, n.3, p.210–218, 2004.
80. KELLING, C. L.; STEFFEN, D. J.; COOPER, V. L. et al. Effect of infection with bovine viral diarrhoea virus alone, bovine rotavirus alone, or concurrent infection with both on enteric disease in gnotobiotic neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, v.63, n.8, p.1179–1186, 2002.
81. KHODAKARAM-TAFTI, A.; MILLER, L. The comparative evaluation of cellular localization of viral antigens with microscopic changes in the ileum of cattle infected with bovine viral diarrhoea. *Comparative Clinical Pathology*, v.15, n.2, p.90–93, 2006.
82. KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111–120, 1980.
83. KISS, I.; SZIGETI, K.; BÁNYAI, K. et al. A snapshot on Pestivirus A strains occurring in Central Europe. *Research in Veterinary Science*, v.152, p.442–445, 2022.
84. LANG-REE, J. R.; VATN, T.; KOMMISRUUD, E. et al. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Veterinary Record*, v.147, n.7, p.191–193, 2000.
85. LANYON, S. R.; HILL, F. I.; REICHEL, M. P. et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal*, v.199, n.2, p.201–209, 2014.
86. LARSSON, B.; JACOBSSON, S. O.; BENGTSSON, B. et al. Congenital curly haircoat as a symptom of persistent infection with bovine virus diarrhoea virus in

- calves. In: *Ruminant Pestivirus Infections: Virology, Pathogenesis, and Perspectives of Prophylaxis*. Vienna: Springer, p.143–148, 1991.
87. LI, Z.; ZHANG, Y.; ZHAO, B. et al. Non-cytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) inhibits innate immune responses via induction of mitophagy. *Veterinary Research*, v.55, n.1, p.27, 2024.
 88. LIEBLER-TENORIO, E. M.; LANWEHR, A.; GREISER-WILKE, I. et al. 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.
 89. LIEBLER-TENORIO, E. M.; POHLENZ, J. F. Experimental mucosal disease of cattle: changes in cell proliferation in lymphoid tissues and intestinal epithelium. *Journal of Comparative Pathology*, v.117, n.4, p.339–350, 1997.
 90. LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhea virus type 2 in calves. *American Journal of Veterinary Research*, v.63, n.11, p.1575–1584, 2002.
 91. LONERGAN, P.; FORDE, N. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal*, v.8, n.S1, p.64–69, 2014.
 92. LUNARDI, M.; HEADLEY, S. A.; LISBÔA, J. A. N. et al. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Research in Veterinary Science*, v.85, n.3, p.599–604, 2008.
 93. MARI, V.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M. S. et al. Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhea virus type 1, type 2 and HoBi-like pestivirus. *Journal of Virological Methods*, v.229, p.1–7, 2016.
 94. MARIAN, L.; WITHOEFT, J. A.; ESSER, M. et al. Uncommon bovine viral diarrhea virus subtype 1e associated with abortions in cattle in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.36, n.1, p.115–119, 2024.
 95. MARIAN, L.; WITHOEFT, J. A.; ROCHA, E. V. et al. Outbreak of BVDV-1b associated with persistent infection, reproductive losses, and congenital malformations in beef cattle in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.57, n.1, p.9, 2025.
 96. MCGOWAN, M. R.; KAFI, M.; KIRKLAND, P. D. et al. Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology*, v.59, n.3–4, p.1051–1066, 2003.
 97. MCGOWAN, M.; MCCOSKER, K.; FORDYCE, G. et al. Epidemiology and management of BVDV in rangeland beef breeding herds in Northern Australia. *Viruses*, v.12, n.10, p.1063, 2020.

98. MCLELAND, S. M.; CIANCIOLO, R. E.; DUNCAN, C. G. et al. A Comparison of Biochemical and Histopathologic Staging in Cats with Chronic Kidney Disease. *Veterinary Pathology*, v.52, n.3, p.524–534, 2015.
99. MCMANUS, C.; BARBOSA, B. R.; HERMUCHE, P. M. et al. Dynamics of cattle production in Brazil. *PLoS One*, v.11, n.1, p.e0147138, 2016.
100. MESEV, E. V.; LEDESMA, R. A.; PLOSS, A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nature Microbiology*, v.4, n.6, p.914–924, 2019.
101. MONTEIRO, F. L.; CARGNELUTTI, J. F.; MARTINS, B. et al. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.31, n.2, p.255–258, 2019.
102. MORALES-AGUILAR, A.; LÓPEZ-REYES, Y.; REGALADO-HUITRÓN, M. et al. The NADL strain of bovine viral diarrhea virus induces the secretion of IL-1 β through caspase-1 in bovine macrophages. *Research in Veterinary Science*, v.131, p.131–136, 2020.
103. MOORTHY, D.; MISHRA, N.; KALAIYARASU, S. et al. Evaluation of currently available bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and HoBi-like pestivirus (HoBiPeV) specific diagnostic tests in detection of highly divergent HoBiPeVs in cattle. *Journal of Virological Methods*, v.272, p.113707, 2019.
104. MOSENA, A. C. S.; FALKENBERG, S. M.; MA, H. et al. Use of multivariate analysis to evaluate antigenic relationships between US BVDV vaccine strains and non-US genetically divergent isolates. *Journal of Virological Methods*, v.299, p.114328, 2022.
105. MUCCELLINI, C. I.; SILVA JÚNIOR, J. V. J.; DE OLIVEIRA, P. S. B. et al. Novel genomic targets for proper subtyping of bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1) and BVDV-2. *Virus Genes*, v.59, n.6, p.836–844, 2023.
106. MURRAY, G. M.; SHARPE, A. E. Nephrotic syndrome due to glomerulopathy in an Irish dairy cow. *Veterinary Record*, v.164, n.6, p.179–180, 2009.
107. NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, v.41, n.1, p.2–7, 2013.
108. NEILL, J. D.; WORKMAN, A. M.; HESSE, R. et al. Identification of BVDV2b and 2c subgenotypes in the United States: Genetic and antigenic characterization. *Virology*, v.528, p.19–29, 2019.
109. NEWCOMER, B. W. Seventy-five years of bovine viral diarrhea virus: current status and future applications of the use of directed antivirals. *Antiviral Research*, v.196, p.105205, 2021.
110. NEWMAN, S. J.; CIANCIOLO, R. E.; MOORE, F. M. The urinary system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. *Pathologic basis of veterinary disease*. 4. ed. St. Louis: Elsevier, p.613–691, 2011.

111. NISKANEN, R.; LINDBERG, A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *The Veterinary Journal*, v.165, n.2, p.125–130, 2003.
112. NODAR, L.; ARNAIZ, I.; PEDREIRA, J. J. et al. Long-term acute infections during a bovine viral diarrhea virus (BVDV) outbreak in a dairy farm from Galicia (NW Spain). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.262, p.110634, 2023.
113. ODEÓN, A. C.; RISATTI, G.; KAISER, G. G. et al. Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Veterinary Microbiology*, v.96, n.2, p.133–144, 2003.
114. OGUEJIOFOR, C. F.; CHENG, Z.; ABUDUREYIMU, A. et al. Global transcriptomic profiling of bovine endometrial immune response in vitro. II. Effect of bovine viral diarrhea virus on the endometrial response to lipopolysaccharide. *Biology of Reproduction*, v.93, n.4, p.101, 2015.
115. OGUEJIOFOR, C. F.; THOMAS, C.; CHENG, Z. et al. Mechanisms linking bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. *Animal Health Research Reviews*, v.20, n.1, p.72–85, 2019.
116. OLAFSON, P.; MACCALLUM, A. D.; FOX, F. H. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Veterinarian*, v.36, p.205–213, 1946.
117. PANG, F.; LONG, Q.; WEI, M. Immune evasion strategies of bovine viral diarrhea virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v.13, p.1282526, 2023.
118. PASSLER, T.; WALZ, P. H. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. *Animal Health Research Reviews*, v.11, n.2, p.191–205, 2010.
119. PATEL, J. R.; SHILLETO, R. W.; WILLIAMS, J. et al. Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. *Archives of Virology*, v.147, n.12, p.2453–2463, 2002.
120. PECORA, A.; MALACARI, D. A.; RIDPATH, J. F. et al. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science*, v.96, n.1, p.204–212, 2014.
121. PEDDIREDI, L.; FOSTER, K. A.; POULSEN, E. G. et al. Molecular detection and characterization of transient bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in cattle commingled with ten BVDV persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.30, n.3, p.413–422, 2018.
122. PEDRERA, M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; RISALDE, M. A. et al. Characterization of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1. *Journal of Comparative Pathology*, v.146, n.1, p.30–39, 2012.
123. PEDRERA, M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; ROMERO-TREVEJO, J. L. et al. Apoptosis in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine

viral diarrhea virus genotype 1: activation of effector caspase-3 and role of macrophages. *Journal of General Virology*, v.90, n.11, p.2650–2659, 2009.

124. PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, v.203, n.2, p.260–268, 1994.
125. PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. BVDV: a pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, v.41, n.1, p.39–51, 2013.
126. POSTEL, A.; SMITH, D. B.; BECHER, P. Proposed update to the taxonomy of pestiviruses: eight additional species within the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *Viruses*, v.13, n.8, p.1542, 2021.
127. POSTLER, T. S.; BEER, M.; BLITVICH, B. J. et al. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Archives of Virology*, v.168, n.9, p.224, 2023.
128. PRAGER, D.; LIESS, B. Nachweis von Immunkomplex-Komponenten in Nierenglomerula bei der bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, v.23, n.5–6, p.458–469, 1976.
129. QI, L.; BEAUNÉE, G.; ARNOUX, S. et al. Neighbourhood contacts and trade movements drive the regional spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Veterinary Research*, v.50, n.1, p.30, 2019.
130. RAJPUT, M. K.; DARWEESH, M. F.; BRAUN, L. J. et al. Comparative humoral immune response against cytopathic or non-cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. *Research in Veterinary Science*, v.129, p.109–116, 2020.
131. RANA, E. A.; GOGOI-TIWARI, J.; ALERI, J. et al. Molecular epidemiology and control strategies for BVDV: a global systematic review from 2000 to 2025. *Veterinary Medicine International*, v.2025, n.1, p.6732453, 2025a.
132. RANA, E. A.; ISLAM, M. S.; HOSSAIN, B. et al. Seroprevalence, molecular characterization, biotyping, and associated risk factors of bovine viral diarrhea in dairy cattle in Bangladesh. *Research in Veterinary Science*, v.202, p.106065, 2025b.
133. READ, A. J.; GESTIER, S.; PARRISH, K. et al. Prolonged detection of bovine viral diarrhoea virus infection in the semen of bulls. *Viruses*, v.12, n.6, p.674, 2020.
134. RICHTER, V.; LEBL, K.; BAUMGARTNER, W. et al. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *The Veterinary Journal*, v.220, p.80–87, 2017.
135. RIDPATH, J. F.; BENDEFELDT, S.; NEILL, J. D.; LIEBLER-TENORIO, E. Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Research*, v.118, n.1–2, p.62–69, 2006.

136. RIKULA, U.; NUOTIO, L.; LAAMANEN, U. I.; SIHVONEN, L. Transmission of bovine viral diarrhoea virus through the semen of acutely infected bulls under field conditions. *Veterinary Record*, v.162, n.3, p.79–81, 2008.
137. RIVAS, J.; HASANAJ, A.; DEBLON, C. et al. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus in cattle in France between 2018 and 2020. *Frontiers in Veterinary Science*, v.9, p.1028866, 2022.
138. ROMERO-PALOMO, F.; RISALDE, M. A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Immunopathologic changes in the thymus of calves pre-infected with BVDV and challenged with BHV-1. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.64, n.2, p.574–584, 2017.
139. SÁ, M. E. P.; DE SÁ, C. V. G.; NICOLINO, R. R. et al. Data on network of live cattle exports from Brazil. *Data in Brief*, v.19, p.1963–1969, 2018.
140. SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; MARS, M. H.; VAN DUIJN, L.; VAN SCHAIK, G. Evaluation of the epidemiological and economic consequences of control scenarios for bovine viral diarrhoea virus in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v.98, n.11, p.7699–7716, 2015.
141. SANTOS, A. S.; ANTONIASSI, N. A.; BOABAID, F. M. et al. Clinical, pathological, immunohistochemical and viral aspects of five calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in a farm of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, p.885–892, 2011.
142. SARRAZIN, S.; VELDHUIS, A.; MÉROC, E. et al. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v.108, n.1, p.28–37, 2013.
143. SCHWEIZER, M.; MÄTZENER, P.; PFAFFEN, G. et al. “Self” and “nonself” manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *Journal of Virology*, v.80, n.14, p.6926–6935, 2006.
144. SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; HASLEBACHER, A. et al. Eradication of bovine viral diarrhoea (BVD) in cattle in Switzerland: lessons taught by the complex biology of the virus. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.702730, 2021.
145. SEONG, G.; OEM, J. K.; CHOI, K. S. Pathogenetic differences after experimental infection of calves with Korean non-cytopathic BVDV-1 and BVDV-2 isolates. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.156, n.1–2, p.147–152, 2013.
146. SHI, H.; LI, H.; ZHANG, Y. et al. Genetic diversity of bovine pestiviruses detected in backyard cattle farms between 2014 and 2019 in Henan Province, China. *Frontiers in Veterinary Science*, v.7, p.197, 2020.

147. SILVA SILVEIRA, C.; MAYA, L.; CASAUX, M. L. et al. Diseases associated with bovine viral diarrhea virus subtypes 1a and 2b in beef and dairy cattle in Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.51, n.1, p.357–368, 2020.
148. SILVA, P. H. H.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. About the necessity of including HoBi-like pestiviruses in bovine respiratory and reproductive viral vaccines. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.41, p.e06914, 2021.
149. SILVEIRA, S.; BAUMBACH, L. F.; WEBER, M. N. et al. HoBi-like pestivirus is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.65, n.1, p.e113–e120, 2018.
150. SILVEIRA, S.; WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S. et al. Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.64, n.2, p.613–623, 2017.
151. SIRAG, M. S.; EL SAYED, E. L.; HUSSEIN, M. M. et al. Immune-pathological studies on the distribution and localization of bovine viral diarrhea virus. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v.10, n.9, p.1916–1923, 2022.
152. SMITH, D. B.; MEYERS, G.; BUKH, J. et al. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *Journal of General Virology*, v.98, n.8, p.2106–2112, 2017.
153. SOSA, E.; MIQUEO, E.; RUSTICHELLI MILLÁN, G. et al. Retrospective analysis of 50 postnatal BVDV outbreaks in cattle from Central Argentina: clinical, pathological, and epidemiological insights. *Viruses*, v.17, n.10, p.1359, 2025.
154. SPETTER, M. J.; LOUGE URIARTE, E. L.; ARMENDANO, J. I. et al. Frequency of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in Argentinean bovine herds and comparison of diagnostic tests for BVDV detection in bovine serum samples: a preliminary study. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.52, n.1, p.467–475, 2021.
155. SPETTER, M. J.; LOUGE URIARTE, E. L.; VERNA, A. E. et al. Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhea virus in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, v.96, p.105089, 2021.
156. STÅHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe: an update. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v.60, suplemento, p.S31–S39, 2012.
157. SU, N.; WANG, Q.; LIU, H. Y. et al. Prevalence of bovine viral diarrhea virus in cattle between 2010 and 2021: a global systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, v.9, p.1086180, 2023.
158. TAUTZ, N.; TEWS, B. A.; MEYERS, G. The molecular biology of pestiviruses. *Advances in Virus Research*, v.93, p.47–160, 2015.
159. 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.

160. THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673–4680, 1994.
161. TOKER, E. B.; YEŞİLBAĞ, K. Molecular characterization and comparison of diagnostic methods for bovine respiratory viruses (BPIV-3, BRSV, BVDV, and BoHV-1) in field samples in northwestern Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, v.53, p.1–11, 2021.
162. TOPLAK, I.; HOSTNIK, P.; ČERNE, D. et al. The principles of the voluntary programme for the control and elimination of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from infected herds in Slovenia. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.676473, 2021.
163. TRANG, N. T.; HIRAI, T.; NABETA, R. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis in a calf with nephrotic syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, v.151, n.2–3, p.162–165, 2014.
164. TSCHOPP, A.; DEISS, R.; ROTZER, M. et al. 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.
165. VALLE, P. S.; MARTIN, S. W.; TREMBLAY, R.; BATEMAN, K. Factors associated with being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the Møre and Romsdal County of Norway. *Preventive Veterinary Medicine*, v.40, n.3–4, p.165–177, 1999.
166. VILCEK, S.; ELVANDER, M.; BALLAGI-PORDANY, A.; BELAK, S. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.9, p.2225–2231, 1994a.
167. VILCEK, S.; HERRING, A. J.; HERRING, J. A. et al. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*, v.136, p.309–323, 1994b.
168. WALZ, P. H.; CHAMORRO, M. F.; FALKENBERG, S. M. et al. Bovine viral diarrhoea virus: an updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.34, n.5, p.1690–1706, 2020.
169. WANG, J.; CHEN, K. Y.; WANG, S. H. et al. Effects of spatial expression of activating transcription factor 4 on the pathogenicity of two phenotypes of bovine viral diarrhoea virus by regulating the endoplasmic reticulum-mediated autophagy process. *Microbiology Spectrum*, v.11, n.2, e04225-22, 2023.

170. WANG, Y.; PANG, F. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus: an overview of currently available methods. *Frontiers in Microbiology*, v.15, p.1370050, 2024.
171. WEBB, B. T.; NORR DIN, R. W.; SMIRNOVA, N. P. et al. Bovine viral diarrhea virus cyclically impairs long bone trabecular modeling in experimental persistently infected fetuses. *Veterinary Pathology*, v.49, n.6, p.930–940, 2012.
172. WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; SIMÕES, S. V. D. et al. 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.
173. WEBER, M. N.; SILVEIRA, S.; MACHADO, G. et al. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*, v.191, p.117–124, 2014.
174. WEBER, M. N.; WOLF, J. M.; DA SILVA, M. S. et al. Insights into the origin and diversification of bovine viral diarrhea virus 1 subtypes. *Archives of Virology*, v.166, n.2, p.607–611, 2021.
175. WERNIKE, K.; BEER, M. Comparison of bovine viral diarrhea virus detection methods: results of an international proficiency trial. *Veterinary Microbiology*, v.290, p.109985, 2024.
176. WERNIKE, K.; BEER, M. International proficiency trial for bovine viral diarrhea virus (BVDV) antibody detection: limitations of milk serology. *BMC Veterinary Research*, v.18, n.1, p.168, 2022.
177. WHITE, M. R.; CROWELL, W. A.; BLUE, J. L. A nephrotic-like syndrome with an associated mesangio-proliferative glomerulopathy in a cow. *Veterinary Pathology*, v.23, n.4, p.439–442, 1986.
178. WISEMAN, A.; SPENCER, A.; PETRIE, L. The nephrotic syndrome in a heifer due to glomerulonephritis. *Research in Veterinary Science*, v.28, n.3, p.325–329, 1980.
179. WITHOEFT, J. A.; MARIAN, L.; DA COSTA, L. S. et al. Sheep abortions associated with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in multiple flocks from Southern Brazil. *Veterinary Research Communications*, p.1–7, 2024.
180. WOA. Bovine viral diarrhoea. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, capítulo 3.4.7, 2024.
181. YEŞILBAĞ, K.; ALPAY, G.; BECHER, P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses*, v.9, n.6, p.128, 2017.
182. YUAN, F.; WANG, L. Genotyping atypical porcine pestivirus using NS5a. *Infection, Genetics and Evolution*, v.92, p.104866, 2021.
183. ZHANG, J.; WANG, W.; YANG, M. et al. Development of a one-step multiplex real-time PCR assay for the detection of viral pathogens associated with the

bovine respiratory disease complex. *Frontiers in Veterinary Science*, v.9, p.825257, 2022.

184. ZHANG, N.; LIU, Z.; HAN, Q. et al. Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. *Virology Journal*, v.8, p.1–8, 2011.
185. ZHU, J.; WANG, C.; ZHANG, L. et al. Isolation of BVDV-1a, 1m, and 1v strains from diarrheal calf in China and identification of its genome sequence and cattle virulence. *Frontiers in Veterinary Science*, v.9, p.1008107, 2022.
186. ZIRRA-SHALLANGWA, B.; GONZÁLEZ GORDON, L.; HERNANDEZ-CASTRO, L. E. et al. The epidemiology of bovine viral diarrhea virus in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, v.9, p.947515, 2022.
187. ZU ERMGASSEN, E. K. H. J.; GODAR, J.; LATHUILLIÈRE, M. J. et al. The origin, supply chain, and deforestation risk of Brazil's beef exports. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.117, n.50, p.31770–31779, 2020.



Assinaturas do documento



Código para verificação: **12H5EEZ0**

Este documento foi assinado digitalmente pelos seguintes signatários nas datas indicadas:



RENATA ASSIS CASAGRANDE (CPF: 004.XXX.539-XX) em 26/02/2026 às 19:57:38

Emitido por: "SGP-e", emitido em 13/07/2018 - 14:59:54 e válido até 13/07/2118 - 14:59:54.

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTlwMjJfMDAwMDYxMDVfNjEwN18yMDI2XzEySDVFRVow> ou o site

<https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00006105/2026** e o código **12H5EEZ0** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.