

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANTIGÊNICA DE
ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS DA DIARRÉIA
VIRAL BOVINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eloisa Bianchi

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANTIGÊNICA DE
ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL
BOVINA**

por

Eloisa Bianchi

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Rudi Weiblen

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANTIGÊNICA DE ISOLADOS
BRASILEIROS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA**

Elaborada por
Eloisa Bianchi

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora

Rudi Weiblen, PhD, UFSM
(Presidente/orientador)

Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM

Charles Fernando Capinos Scherer, PhD, HIPRA

Santa Maria, 16 fevereiro de 2011

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANTIGÊNICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA

AUTOR: ELOISA BIANCHI

ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, 16 de fevereiro de 2011

Amostras de campo do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) apresentam diferenças genéticas e antigênicas que podem influenciar no diagnóstico e na produção de vacinas. Os objetivos do presente trabalho foram selecionar e caracterizar isolados de BVDV para potencial uso em testes de diagnóstico e vacinas, e caracterizar genética e antigenicamente amostras de BVDV isoladas no Rio Grande do Sul (RS) entre 2000 e 2010. O *capítulo 1* relata a caracterização em nível molecular e antigênico de sete isolados citopáticos brasileiros do BVDV. O sequenciamento e análise filogenética identificaram quatro isolados do genótipo BVDV-1 (57,1%) e três isolados do genótipo BVDV-2 (42,8%). A caracterização antigênica dessas amostras por vírus neutralização (VN) com soro homólogo e heterólogo revelou diferenças importantes nos títulos neutralizantes entre os vírus do mesmo genótipo, mas principalmente entre vírus de diferentes genótipos. Apesar dessas diferenças antigênicas, a atividade neutralizante do anti-soro das amostras IBSP-4 e VS26/2 foi aceitável contra amostras do mesmo genótipo e também contra amostras de genótipo diferente. Esses resultados qualificam esses isolados para potencial uso em formulações vacinais. Em paralelo, 446 amostras de soro campo foram testadas por VN frente aos sete isolados e contra cepas padrão de BVDV-1 e 2. Destas, 221 amostras (50,3%) apresentaram anticorpos neutralizantes anti-BVDV, sendo que 198 (89,6%) apresentaram atividade frente às cepas padrões dos dois genótipos (Singer, BVDV-1 e VS-253, BVDV-2). Por outro lado, 18 amostras de soro (8,1%) neutralizaram apenas a cepa de BVDV-1 e 5 (2,2%) a cepa BVDV-2. Apesar das diferenças antigênicas entre os genótipos, esses resultados não indicam a necessidade de testar as amostras de soro para ambos os genótipos, uma vez que o número de amostras de soro que não é detectada por um ou outro genótipo foi pequena. O *capítulo 2* apresenta um perfil genotípico e antigênico de 20 amostras do BVDV isoladas no RS, entre 2000 e 2010. As amostras foram isoladas de uma variedade de condições clínicas. A maioria das amostras (19 ou 95%) pertence ao biótipo não-citopático (NCP); e um isolado (5%) apresentou uma mistura de vírus NCP e citopáticos (CP). O sequenciamento e a análise filogenética permitiram identificar nove isolados de BVDV-2 (45%), oito isolados de BVDV-1 (40%) e três isolados BVDV atípicos. Análise de reatividade com um painel de 20 anticorpos monoclonais (AcMs) contra a glicoproteína principal do envelope gp53/E2 revelou uma variabilidade marcante nesta glicoproteína, entre vírus do mesmo genótipo, e sobretudo, entre vírus de genótipos diferentes. Testes de VN com anti-soro de cepas de referência de BVDV-1 e BVDV-2 frente às amostras isoladas revelaram níveis variáveis de reatividade cruzada entre vírus do mesmo genótipo, e reatividade ausente ou muito baixa entre vírus de genótipos diferentes. Esses resultados indicam a presença de ambos os genótipos do BVDV na população do RS, e confirmam a marcante variabilidade antigênica desses isolados.

Palavras-chave: BVDV-1, BVDV-2, *Pestivirus*, análise filogenética, análise antigênica.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

GENETIC AND ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN ISOLATES OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS ISOLATES

AUTHOR: ELOISA BIANCHI

ADVISER: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, 16th February 2011.

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates display a high genetic and antigenic variability that can compromise diagnosis and vaccine formulation. This study aimed to characterize at genetic and antigenic levels Brazilian BVDV isolates for potential use in diagnosis and vaccine production, and to characterize field BVDV isolates from Rio Grande do Sul (RS) (2000-2010). *Chapter 1* describes the genetic and antigenic characterization of seven cytopathic Brazilian BVDV isolates, to select the most appropriate for use in diagnostic and vaccines. Sequencing and phylogeny identified four isolates of BVDV-1 (57.1%) and three isolates of BVDV-2 genotype (42.8%). The antigenic characterization of these isolates by virus neutralization assay (VN) with homologous and heterologous antisera revealed differences among the viruses of the same genotype, but especially among viruses of different genotypes. Despite the antigenic differences, the neutralizing activity of antisera IBSP-4 and VS26/2 was acceptable against isolates of the same genotype and also against viruses of different genotype. These results qualify these isolates for potential use in vaccine formulations. In parallel, 446 field serum samples were tested against the seven isolates and reference strains. Neutralizing antibodies anti-BVDV were found in 221 (50.3%) samples, and 198 (89.6%) had neutralizing activity against the both genotypes (Singer, BVDV-1 and VS- 253, BVDV-2), 18 (8.1%) serum samples and five (2.2%) neutralized only the standard BVDV-1 and BVDV-2. These results confirm that the antigenic differences between isolates may result in false-negative results, yet might not justify the performance of VN using both BVDV genotypes. *Chapter 2* presents a genotypic and antigenic profile of 20 BVDV isolates obtained in RS state, between 2000 and 2010. The isolates were isolated from a variety of clinico-pathological syndromes. Most samples (19 or 95%) belong to biotype non-cytopathic (NCP) and one isolate (5%) had a mixture of viruses NCP and cytopathic (CP). Sequencing and phylogenetic analyses identified nine isolates of BVDV-2 (45%), eight BVDV-1 (40%) and three atypical BVDV isolates. Analysis of reactivity with a panel of 20 monoclonal antibodies (mAbs) revealed a marked variability in the major envelope glycoprotein gp53/E2 among viruses of the same genotype, but especially between different virus genotypes. Virus neutralization assays (VN) with antisera of BVDV-1 and BVDV-2 reference strains against the isolates revealed variable levels of cross-reactivity between viruses of the same genotype, and lack or very low reactivity between viruses of different genotypes. These results indicate the presence of both genotypes of BVDV in the cattle population of RS and confirm the remarkable antigenic diversity of these isolates.

Key words: BVDV-1, BVDV-2, *Pestivirus*, phylogenetic analysis, antigenic analysis.

LISTA DE FIGURAS

2. CAPÍTULO 1

FIGURA 1 (Fig.1) - Árvore filogenética construída com base nas sequências de nucleotídeos da região 5'UTR de sete isolados citopáticos do vírus da diarreia viral bovina. Utilizou-se método o *Neighbor - Joining* e análise *bootstrap* com 1000 réplicas, modelo *P – distance* pelo programa MEGA

5.0..... 30

3. CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 (Fig.1) - Árvore filogenética construída com base nas sequências de nucleotídeos da região 5'UTR de 20 isolados do vírus da diarreia viral bovina. Utilizou-se método o *Neighbor - Joining* e análise *bootstrap* com 1000 réplicas, modelo *P - distance* pelo programa MEGA 5.0..... 52
- FIGURA 2 (Fig.2) - Títulos de anticorpos neutralizantes de anti-soro produzido contra cepas de referência e contra dois isolados brasileiros do vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) frente a 20 isolados do BVDV. As barras em negrito representam os títulos neutralizantes contra o vírus homólogo, e as barras em branco contra os vírus heterólogos..... 53

LISTA DE TABELAS

2. CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Títulos de anticorpos neutralizantes de cada anti-soro frente aos sete isolados citopáticos do vírus da diarreia viral bovina (BVDV); e coeficiente de similaridade antigênica (R) entre os isolados e cepas padrão do BVDV.....	28
TABELA 2 - Resultados dos testes de vírus neutralização (VN) realizados com cepas de referência e sete isolados citopáticos do vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) frente amostras de soro enviadas para diagnóstico sorológico.....	29

LISTA DE QUADROS

2. CAPÍTULO 2

- QUADRO 1 - Identificação, origem, biotipo (não-citopatogênico: NCP e citopatogênico: CP) e genótipo das amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas no Rio Grande do Sul – Brasil (2000 – 2010)..... 50
- QUADRO 2 - Reatividade de anticorpos monoclonais (AcMs) específicos contra a gp53/E2 com amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas no Rio Grande do Sul (2000 a 2010)..... 51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. CAPÍTULO 1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS CITOPÁTICAS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA PARA USO EM DIAGNÓSTICO E VACINAS.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e métodos.....	17
Resultados e discussão.....	19
Conclusão.....	24
Referências.....	24
3. CAPÍTULO 2. PERFIL GENOTÍPICO E ANTIGÊNICO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA ISOLADAS NO RIO GRANDE DO SUL – BRASIL (2000 – 2010).....	31
Abstract.....	32
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Material e métodos.....	37
Resultados e discussão.....	40
Referências.....	46
4. CONCLUSÕES FINAIS.....	54
5. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é responsável por importantes perdas à atividade pecuária de corte e leite em todo o mundo, devido à sua grande distribuição e pela capacidade de produzir diversas manifestações clínicas (HOUE, 1999). O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, juntamente com outros dois importantes vírus de animais domésticos – o vírus da peste suína clássica (CFSV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) (HORZINEK, 1991).

Os vírions do BVDV possuem 40 – 60 nm de diâmetro, um nucleocapsídeo icosaédrico contendo o genoma viral que é formado por uma fita simples de RNA linear de sentido positivo com aproximadamente 12.300 – 12.500 nucleotídeos. O nucleocapsídeo é envolto por um envelope lipoprotéico, que contém três glicoproteínas: gp48/E^{ms}, gp25/E1 e gp53/E2, a qual é a mais antigênica (DONIS, 1995). O genoma RNA possui duas regiões não traduzidas (“untranslated regions”, UTRs) nas extremidades 5’ (aproximadamente com 386 nucleotídeos) e 3’ (aproximadamente com 223 nucleotídeos) e uma fase de leitura aberta (“open reading frame”, ORF) que codifica uma única poliproteína com 3988 aminoácidos. A poliproteína é processada por proteases virais e celulares em 11 ou 12 proteínas maduras, durante e após a tradução. Os produtos destas clivagens são: autoprotease N-terminal (N^{pro}), proteína do capsídeo (C), proteínas do envelope (E^{ms}, E1 e E2) e proteínas não-estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (COLLETT et al., 1988; THIEL et al., 1996).

Com base na comparação das sequências de nucleotídeos da região altamente conservada, 5’UTR, é possível classificar os isolados de BVDV em dois genótipos geneticamente diferentes: BVDV-1 e BVDV-2. Os isolados de BVDV-1 podem ainda ser classificados em 11 subgenótipos, e o BVDV-2, em dois subgenótipos (RIDPATH, et al., 1994; VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2002). Outras regiões do genoma como a N^{pro}, gp53/E2, gp48/E^{ms}, C também têm sido utilizadas para estudar a diversidade genética entre os isolados e, assim, agrupá-los dentro de seus respectivos genótipos e subgenótipos (BECHER et al., 2003; MINAMI, et al., 2009; LIU, et al., 2010). Além disso, essas novas análises filogenéticas permitiram que alguns isolados de BVDV fossem denominados como um novo grupo de pestivirus “atípicos” (SCHIRRMIEIER et al., 2004; STALDER, et al., 2005; STAHL, et al., 2007). Parte dessa diversidade genética entre os isolados de campo de BVDV é acompanhada

por variabilidade antigênica, que pode ser verificada pela análise com o uso de monoclonais e por sorologia cruzada (RIDPATH, 2003).

As amostras de BVDV apresentam ainda diferenças na capacidade de produzir citopatologia em células de cultivo, podendo ser classificadas em dois biótipos: não-citopatogênicos (NCP) ou citopatogênicos (CP). Ambos os biótipos circulam nas espécies susceptíveis, mas as amostras NCP são predominantes. As amostras CP não ultrapassam 5%, sendo encontradas, sobretudo, em animais que desenvolvem uma doença fatal chamada de doença das mucosas (DM) (DUBOVI, 1992). Os vírus CP são gerados a partir de mutações ou rearranjos genéticos, como duplicações ou inserções no genoma viral, na região do gene da proteína NS2-3. Ambos os biótipos possuem a proteína NS2-3, mas somente nos vírus CP ela é clivada gerando outra proteína, a NS3 (DONIS, 1995).

No Brasil, o BVDV foi isolado pela primeira vez por VIDOR (1974), e vários estudos posteriores confirmaram a presença do agente (OLIVEIRA et al., 1996; BOTTON et al., 1998b). Os prejuízos econômicos da infecção estão mais atribuídos à infecção de fêmeas prenhes, mas outras formas clínicas, como doença respiratória ou gastroentérica aguda e crônica, lesões cutâneas são observadas. Em rebanhos onde a infecção é endêmica, as falhas reprodutivas são os sinais mais evidentes e, muitas vezes, o único indicativo da infecção (FLORES et al., 2005). A infecção de fêmeas prenhes pode cursar com reabsorção embrionária, abortamentos, mumificações, malformações fetais, nascimento de terneiros fracos, persistentemente infectados (PI) e imunotolerantes ao vírus (BAKER, 1995).

O nascimento de animais imunotolerantes é resultado da infecção transplacentária entre os dias 45 e 125 de gestação, com amostras NCP (McCLURKIN et al., 1984). Os animais PI excretam grandes quantidades de vírus nas secreções e excreções, durante toda a vida, constituindo-se no principal reservatório do vírus (BAKER, 1995; HOUE, 1995). Os animais PI estão presentes na população em um número relativamente pequeno (0,4 a 2,7%), mas ainda constituem o principal meio de perpetuação do vírus nos rebanhos (HOUE, 1995).

O controle da infecção pelo BVDV baseia-se na identificação e eliminação dos animais PI, associado ou não ao uso de vacinas para proteger os animais susceptíveis (DUBOVI, 1992; BOLIN, 1995; VAN OIRSCHOT et al., 1999). O uso da vacinação no controle da infecção geralmente se baseia em uma análise de riscos e custos (VAN OIRSCHOT et al., 1999; HOUE et al., 2006).

No Brasil, alguns anos atrás eram somente comercializadas vacinas inativadas contendo cepas norte-americanas e européias do BVDV-1. Nos últimos anos, vacinas contendo ambos os genótipos virais (BVDV-1 e BVDV-2) estão presentes no mercado, trazendo uma

contribuição, garantindo uma melhor resposta sorológica, uma vez que vacinas contendo apenas o genótipo BVDV-1 não induzem boa resposta sorológica frente ao BVDV-2 (FULTON & BURGE, 2001; VOGEL et al., 2001; 2002). Outra forma de minimizar o problema das diferenças antigênicas seria a formulação de vacinas com vírus representativo das amostras circulantes na população, pois teoricamente essas apresentam maiores semelhanças genéticas e antigênicas (FLORES et al., 2005).

A diversidade antigênica do BVDV também pode possuir implicações no diagnóstico (FLORES et al., 2005). A baixa reatividade sorológica cruzada entre os dois genótipos observada nos testes de vírus neutralização (VN) pode interferir no resultado dos testes sorológicos, podendo resultar em falhas na detecção de animais com baixos títulos de anticorpos. Uma possível solução seria a utilização de amostras virais isoladas na região nesses testes (FLORES et al., 2005).

Considerando-se as diferenças genéticas e antigênicas existentes entre as amostras vacinais e isolados de campo de BVDV, e o seu possível impacto no diagnóstico e produção de vacinas, o presente trabalho teve como objetivos: a. Selecionar e caracterizar isolados citopáticos de BVDV para potencial uso em testes de diagnóstico e vacinas, e b. Caracterizar geneticamente e antigenicamente isolados de BVDV do Rio Grande do Sul, obtidos durante o período de 2000 a 2010.

2. CAPÍTULO 1

Seleção e caracterização de amostras citopáticas do vírus da diarreia viral bovina para uso em diagnóstico e vacinas

Eloisa Bianchi¹, Mathias Martins¹, Fernando Viçosa Bauermann¹, Rudi Weiblen¹ & Eduardo Furtado Flores^{1*}

(Artigo a ser submetido à revista *Ciência Rural* – 2011)

¹ Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: E.F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-900. Fone/fax + (55) 55 3220-8034. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

RESUMO

A grande diversidade genética e antigênica do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) pode possuir implicações para o diagnóstico e produção de vacinas. O presente estudo teve por objetivo caracterizar em nível molecular e antigênico sete isolados citopáticos brasileiros do BVDV, para potencial uso em testes de neutralização viral (VN) e vacinas. O sequenciamento e a análise filogenética com base nas sequências de nucleotídeos da região não traduzida (5'UTR) do genoma viral identificaram quatro isolados do genótipo BVDV-1 (57,1%) e três isolados do genótipo BVDV-2 (42,8%). A caracterização antigênica dos isolados por testes de VN revelou diferenças de até 256 vezes nos títulos de anticorpos neutralizantes quando se comparou a neutralização homóloga com a heteróloga de alguns isolados de BVDV-1. Entre os vírus do genótipo tipo 2, as diferenças do títulos homólogos com os títulos heterólogos atingiram até 248 vezes. Apesar das diferenças antigênicas entre os isolados, a atividade neutralizante dos anti-soro dos isolados brasileiros IBSP-4 (BVDV-1) e VS26/2 (BVDV-2) foi aceitável contra amostras do mesmo genótipo e também contra amostras de genótipo diferente. Esses resultados qualificam esses isolados para uso em formulações vacinais. Com o objetivo de escolher a amostra mais indicada para uso em testes de VN, 446 amostras de soro de campo foram testadas frente aos sete isolados e contra cepas padrão de BVDV-1 e 2. Destas, 221 amostras (50,3%) apresentaram anticorpos neutralizantes anti - BVDV, sendo que 198 (89,6%) apresentaram atividade frente às cepas padrões dos dois genótipos (Singer, BVDV-1 e VS-253, BVDV-2). Por outro lado, 18 amostras de soro (8,1%) neutralizaram apenas a cepa de BVDV-1 e 5 (2,2%) a cepa BVDV-2. Esses resultados confirmam que as diferenças antigênicas entre os isolados podem gerar falhas na detecção de animais soropositivos para um ou outro genótipo. Porém, considerando-se a amostragem de soro testada e os isolados testados, não haveria a necessidade da inclusão dos isolados

brasileiros ou de ambos os genótipos nos testes de VN, uma vez que se verificaram resultados semelhantes entre eles.

Palavras-chave: BVDV, diversidade antigênica, análise filogenética, vírus neutralização.

ABSTRACT

The genetic and antigenic diversity among field isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) are important issues for diagnosis and vaccine production. The objective of the present study was to characterize antigenically and in molecular level seven Brazilian cytopathic BVDV, to select the most adequate isolate for use in diagnostic and vaccines. Sequencing and phylogenetic analysis of the 5'UTR region of the viral genome identified four isolates within the BVDV-1 genotype (57.1%) and three BVDV-2 (42.8%). The antigenic characterization of these isolates by virus neutralization assays (VN) revealed significant differences the titers of 256 were observed when comparing the homologous with heterologous neutralization of some isolates of BVDV-1. Among the type 2 virus genotype, differences of titers the 248 were observed among titers homologous with heterologous titers. Despite the antigenic differences among the viruses, mainly between the genotypes, the neutralizing activity of two isolates: IBSP-4 (BVDV-1) and VS26/2 (BVDV-2), suggest their use in vaccine formulations, due the ability to induce moderate to high antibody titers to both genotypes. In order to choose the most suitable isolate for use in VN assays, 446 field serum samples were tested against the seven isolates and standard strains. Neutralizing antibodies anti-BVDV were found in 221 (50.3%) samples, and 198 (89.6%) had neutralizing activity against the both genotypes (Singer, BVDV-1 and VS- 253, BVDV-2), 18 (8.1%) serum samples and five (2.2%) neutralized only the standard BVDV-1 and BVDV-2, respectively. Although these antigenic differences may eventually result in diagnostic failures, our results

indicate that the use of Brazilian isolates or strains of both genotypes in VN tests is not necessary.

Key words: BVDV, antigenic difference, phylogenetic analysis, virus neutralization.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) é um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, juntamente com o vírus da doença da fronteira (BDV) de ovinos e o vírus da peste suína clássica (CSFV) (HORZINEK, 1991). O BVDV é um vírus envelopado, com genoma RNA de fita simples, com aproximadamente 12,3 kb, o qual contém uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína com 3988 aminoácidos (COLLETT et al., 1988). A ORF é precedida por uma região não traduzida (5'UTR) com 360 a 390 nucleotídeos, altamente conservada entre os *Pestivirus* e frequentemente utilizada para caracterização genética (COLLETT et al., 1988; RIDPATH et al., 1994). Com base na comparação das sequências da região 5'UTR, os isolados do BVDV têm sido agrupados em dois genótipos, que são também antígenicamente distintos entre si: BVDV-1 e BVDV-2 (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994). Os isolados de BVDV-1 podem ser ainda sub-divididos em 11 subgenótipos (VILCEK et al., 2001), e o BVDV-2, em dois subgenótipos (FLORES et al., 2002). As amostras de campo do BVDV isoladas no Brasil apresentam diferenças genéticas e antigênicas marcantes entre si, o que pode gerar implicações para o diagnóstico, produção de vacinas e programas de controle da doença (BOTTON et al., 1998a; FLORES et al., 2002).

Os *Pestivirus* caracterizam-se também pela existência de dois biotipos: citopático (CP) e não citopático (NCP), de acordo com o efeito da replicação viral em cultivo celular

(LINDENBACH & RICE, 2001). Cepas CP são utilizadas tanto para a formulação de vacinas quanto para os testes de diagnóstico, por vírus neutralização (VN).

O diagnóstico sorológico da infecção pelo BVDV é realizado principalmente por testes de neutralização viral (VN) e testes de ELISA. No entanto, os testes de VN podem falhar em detectar animais com baixos títulos de anticorpos previamente infectados com amostras virais diferentes das cepas utilizadas nos testes (FLORES et al., 2005). Uma possível solução para a redução de diagnósticos falso-negativos seria a utilização de amostras virais regionais nesses testes (FLORES et al., 2000). A grande diversidade antigênica verificada entre isolados de campo também representa uma dificuldade para o controle baseado em proteção vacinal (FLORES et al., 2005). Assim, os objetivos deste trabalho foram selecionar e caracterizar isolados CP do BVDV para uso potencial em diagnóstico (testes de VN) e possível inclusão em formulações vacinais.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental – Sete isolados brasileiros CP do BVDV foram selecionados e caracterizados geneticamente, por meio de sequenciamento e análise filogenética da região 5'UTR do genoma viral, e antigenicamente, por meio de testes de vírus neutralização (VN) frente à anti - soros homólogos e heterólogos. Os isolados também foram utilizados em testes de VN frente a amostras de soro de bovinos enviados ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (SV/UFSM) para diagnóstico sorológico.

Células e vírus – Os procedimentos de cultivo celular, amplificação, clonagem biológica, quantificação viral e VN foram realizados em células de linhagem de rim bovino (MDBK) livres de *Pestivirus*. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM),

suplementado com 10% de soro equino, estreptomicina^a (0,4mg por mL), penicilina^a (1,6mg por mL) e anfotericina B^a (0,0025mg por mL). A origem dos sete isolados virais CP brasileiros selecionados (SV357/04, SV323/04, VS26/2, IBSP-2, IBSP-4, M-35, VS-28), e cepas padrão, foi relatada anteriormente por FLORES et al. (2005). Os vírus CP utilizados nos procedimentos foram purificados por clonagem biológica de acordo com BOTTON et al. (1998b).

Extração de RNA, RT-PCR, sequenciamento e análise filogenética – Para a caracterização molecular, células MDBK foram infectadas com cada amostra individualmente em frascos de 25cm². O RNA foi extraído dessas células, utilizando-se o reagente Trizol^b de acordo com o fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total utilizando um *Kit* comercial *SuperScriptTM III RT^b* o qual serviu de molde para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação da sequência alvo do BVDV. O par de *primers* (P1 e P2) (RIDPATH & BOLIN, 1998) serviu para amplificar um fragmento de 270 pb localizado na região 5'UTR do genoma viral. Os produtos da amplificação da PCR foram purificados com o uso do *Kit* comercial PCR *PureLink^b* e submetidos ao sequenciamento em duplicata e processados em sequenciador automático MEGABACE 500. A pureza das sequências foi avaliada pelo pacote do programas *Staden Package* (STADEN, 1996), sendo então alinhadas para a obtenção de uma sequência consenso e posteriormente submetidas ao BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para comparação com sequências depositadas no *GenBank*, classificando os isolados em dois genótipos. O alinhamento das sequências e a edição das sequências pelo programa BioEdit, versão 7.0.9 (HALL, 1999). A construção da árvore filogenética dos isolados, cepas padrão do BVDV e cepas de referência de outros pestivírus foi realizada utilizando o programa MEGA versão 5.0, pelo método *Neighbor - Joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*, modelo *P- distance*.

Reatividade sorológica cruzada – Para investigar a reatividade sorológica cruzada, anti - soro específico para cada uma das amostras CP e para as duas cepas padrão foram produzidos em bezerros soronegativos. Cada animal recebeu uma injeção via intramuscular com o sobrenadante do cultivo de células infectadas, contendo aproximadamente $10^{7,0}$ DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares por mL) do respectivo vírus. Aos 30 dias pós-inoculação, o sangue foi coletado para obtenção do soro para a realização dos testes de VN. A detecção e quantificação dos anticorpos contra o BVDV foi realizada pela técnica de VN, conforme descrito por BOTTON et al. (1998a). A atividade neutralizante de cada soro foi testada frente às cepas padrão, ao vírus homólogo, e frente aos demais isolados. Os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos foram combinados entre os vírus para determinar o coeficiente de similaridade antigênica (R), de acordo com o cálculo utilizado por HOWARD et al. (1987).

Testes de vírus neutralização com amostras de soro de campo – Finalmente, 446 amostras de soro bovino submetidas ao SV/UFSM para diagnóstico sorológico foram testadas frente aos sete isolados CP e à duas cepas de referência do BVDV pela técnica de VN em microplacas, de acordo com BOTTON et al. (1998a).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise genética – Das sete amostras CP analisadas, quatro pertencem ao genótipo BVDV-1 (57,1%) (IBSP-2, IBSP-4, VS-28, M-35) e três ao genótipo BVDV-2 (42,8%) (SV 323/04, SV 357/04 e VS26/2). Esses resultados confirmam a circulação de ambos os genótipos no rebanho bovino brasileiro (GIL, 1998; FLORES et al., 2002; 2005). O genótipo tipo 1 foi predominante entre os isolados analisados, concordando com resultados de GIL (1998) e

FLORES et al. (2000), mas o percentual de BVDV-2 foi superior ao verificado nos estudos anteriores. A proporção de BVDV-1 e BVDV-2 pode variar de acordo com a região investigada (BACHOFEN et al., 2008; KABONGO et al., 2003). Destaca-se que este estudo envolveu uma amostragem pequena de isolados, podendo não refletir a proporção real de BVDV-1 e BVDV-2 circulantes na população bovina.

O alinhamento das sequências de nucleotídeos da região 5'UTR permitiu a construção de uma árvore filogenética dos isolados (Figura 1). Cada isolado de BVDV foi agrupado no ramo do seu respectivo genótipo, distantes dos ramos das cepas de outros pestivírus. Estudo anterior confirmou que amostras genotipicamente classificadas como tipo 2 são antigenicamente diferentes das amostras classificadas como tipo 1 (FLORES et al., 2000). Essas diferenças moleculares e antigênicas têm indicado a necessidade de uma reavaliação das estratégias de diagnóstico e imunização contra o BVDV (GIL, 1998). A necessidade de incluir amostras do tipo 2 dentro das formulações de vacinas, para se obter um espectro mais amplo de proteção, devido a baixa reatividade sorológica cruzada entre os genótipos (RIDPATH, 2003). No entanto, a necessidade de inclusão de vírus de diferentes subgenótipos nas vacinas ainda é controversa, pois nem sempre as diferenças genéticas estão relacionadas diretamente com diferenças antigênicas associadas com proteção (FLORES et al., 2005; RIDPATH et al., 2010).

A análise filogenética é o método de escolha para classificar geneticamente os isolados do BVDV (RIDPATH, 2005; 2010). Os dois genótipos do BVDV são identificados historicamente com base na comparação da região 5'UTR (PELLERIN et al., 1994) por ser uma região altamente conservada entre os *Pestivirus*. Devido às diferenças genéticas existentes entre os isolados de um mesmo grupo, estudos atuais com o BVDV vêm utilizando análises filogenéticas com base na análise concomitante de outros genes, como a N^{pro} e E2 (LIU et al., 2010). Essas análises mais detalhadas têm permitido classificar os

isolados em subgrupos (1a-11 e 2a-2b), permitindo de forma mais objetiva conhecer as diferenças genéticas, bem como estabelecer uma origem comum entre os grupos de *Pestivirus*.

Reatividade sorológica entre os isolados – Diferenças antigênicas importantes têm sido identificadas entre vírus dos dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2) utilizando-se o teste de VN (BECHER et al., 2003). Os títulos de anticorpos neutralizantes de cada anti-soro contra o vírus homólogo e contra os vírus heterólogos no presente estudo estão apresentados na tabela 1. Diferenças de até 256 vezes nos títulos foram observadas quando se comparou a neutralização homóloga com a neutralização heteróloga de alguns isolados de BVDV-1. Já entre os vírus do genótipo tipo 2, as diferenças dos títulos homólogos com os títulos heterólogos atingiram até 248 vezes. Considerando-se os objetivos do presente trabalho, cabe destacar a atividade neutralizante do anti-soro do isolado IBSP-4 (BVDV-1), que apresentou títulos altos contra os membros do grupo homólogo e títulos moderados a altos contra os vírus do grupo heterólogo. O anti-soro dos vírus VS26/2 (BVDV-2) reagiu com títulos neutralizantes altos contra o BVDV-2 e moderados a altos contra o BVDV-1.

A atividade neutralizante dos anticorpos contra o BVDV é direcionada predominantemente contra a glicoproteína E2 do envelope viral (CORAPI et al., 1990). Essa glicoproteína apresenta alto grau de variabilidade na sua estrutura, entre isolados e genótipos de BVDV (BECHER et al., 1994). Alterações significativas nesses epítopos podem resultar em falha ou escape de atividade neutralizante, podendo resultar em falha de proteção vacinal, por exemplo. BOTTON et al. (1998a) e FLORES et al. (2000) demonstraram a grande variabilidade antigênica existente entre amostras brasileiras do BVDV utilizando anticorpos monoclonais (AcMs). BOTTON et al. (1998a) também caracterizaram alguns isolados por neutralização cruzada, confirmando a baixa reatividade sorológica entre amostras brasileiras e cepas vacinais norte-americanas Singer, NADL e Oregon.

Vários estudos demonstram que, isolados de BVDV-1 são antigenicamente mais relacionados entre si do que entre os BVDV-2 (PELLERIN et al., 1994; AVALOS-RAMIREZ et al., 2001; RIDPATH et al., 2010). No entanto, em alguns casos, as diferenças antigênicas entre as cepas BVDV-1 de diferentes subgenótipos podem apresentar valores similares aos encontrados comparando-se BVDV-1 e BVDV-2. No presente estudo, os isolados IBSP-4, VS26/2 foram capazes de induzir anticorpos neutralizantes que reagiram contra vírus de ambos os genótipos. Assim sugere-se que estes isolados sejam utilizados futuramente em testes “*in vivo*”, avaliando a capacidade de proteção desafiando-os com um número maior de cepas e, desta forma, estes isolados podem ser candidatos potenciais para uso em formulações vacinais.

Os títulos da VN foram transformados em coeficientes R, que indicam os níveis de similaridade antigênica entre os vírus (tabela 1). Valores de R que se aproximam de 100 indicam maior similaridade antigênica entre os isolados; valores abaixo de 25 indicam diferenças antigênicas que são frequentemente observadas entre diferentes cepas de vírus, e valores abaixo de cinco são indicativos de diferentes tipos sorológicos (HOWARD et al., 1987). Os valores encontrados no presente trabalho confirmam os resultados da análise filogenética, demonstrando que as amostras pertencentes a cada genótipo são antigenicamente semelhantes entre si, e diferentes das amostras do outro genótipo. Geralmente, o que é observado são diferenças antigênicas entre isolados pertencentes a genótipos diferentes, mas essa discrepância também é verificada entre isolados pertencentes ao mesmo genótipo (MINAMI et al., 2009).

Neutralização frente a amostras de soro de campo – Os resultados dos testes de VN com 446 amostras de soro da rotina de diagnóstico do SV/UFSM, testadas contra cada isolado CP e cepas de referência (tabela 2), demonstraram que 221 amostras (50,3%) apresentaram anticorpos neutralizantes anti-BVDV. Destas, 198 (89,6%) apresentaram atividade

neutralizante contra o vírus dos dois genótipos, 18 (8,1%) neutralizaram apenas a cepa de BVDV tipo 1 (Singer) e cinco (2,2%), a cepa BVDV tipo 2 (VS-253). Dentre os isolados testados, 220 amostras (50,1%) apresentaram anticorpos neutralizantes para o IBSP-4, 209 (47,2%) para o IBSP-2, 218 (49,6%) para o VS-28, 216 (49,2%) para o M-35, 221 (50,3%) para a cepa Singer, 208 (47,3%) para o SV 357/04, 205 (46,6%) para o SV 323/04, 208 (47,3%) para o VS26/2 e 209 (47,6%) para a cepa VS-253. Esses resultados demonstram que os vírus do genótipo tipo 1 foram capazes de neutralizar (ou detectar como positivas no teste) um número maior de amostras de soro. Isso se deve possivelmente a circulação predominante de vírus do tipo 1 na população estudada, já que entre os isolados testados, a cepa padrão Singer foi a que reagiu com maior número de amostras. Já os isolados do genótipo 2 reagiram com um número menor de amostras, também provavelmente refletindo a menor circulação de vírus desse genótipo na população estudada. Outros estudos já haviam mostrado maior circulação de vírus do genótipo tipo 1 (FLORES et al., 2005). Em resumo, apesar da diversidade antigênica do BVDV, para a região do estudo, o uso de diferentes isolados de BVDV-1 e 2 em testes VN não resultaria em detecção de um maior número de amostras positivas, já que a porcentagem de amostras soropositivas detectadas na VN com a cepa padrão Singer foi maior. Alguns pesquisadores enfatizam a necessidade da utilização de cepas do BVDV-1 e do BVDV-2 nos testes de VN. No entanto, alguns estudos no Brasil demonstraram que isso parece não ser necessário. FLORES et al. (2000) testaram 1.134 amostras de soro de animais não vacinados contra cepas padrão de BVDV (Singer e VS253), 2,5% foram positivas apenas para o BVDV-1 e 3,3% reagiram positivamente apenas para o BVDV-2. Já DIAS et al. (2010) avaliaram 1.925 amostras de soro também de animais não vacinados e os resultados encontrados foram semelhantes quando testados com as mesmas cepas padrão, 51 (2,65%) amostras reagiram apenas ao BVDV-1 e 67 (3,5%) reagiram apenas ao BVDV-2. Considerando-se esses diferentes resultados falso-negativos seriam obtidos se as

amostras fossem testadas apenas contra um dos genótipos do BVDV, em regiões onde circulam vírus dos dois genótipos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem o uso dos isolados IBSP-4 e VS26/2 como possíveis candidatos a cepas vacinais, uma vez que os respectivos anti-soros foram capazes de neutralizar em títulos moderados a altos os vírus dos genótipos 1 e 2 nos testes de VN. Assim, possuem um espectro mais amplo de reatividade sorológica e, provavelmente, maior capacidade de proteção frente as diferentes cepas circulantes na região. Para os testes de VN, sugere-se que não há necessidade de se incluir isolados locais, pois os resultados obtidos, e o número de amostras reagentes, foram semelhantes quando se utilizou as cepas padrão.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a- Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, USA.
- b- Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA

REFERÊNCIAS

- AVALOS-RAMIREZ, R. et al. Evidence for the presence of two novel *Pestivirus* species. **Virology**, v. 286, p. 456-465, 2001.

- BACHOFEN, C. et al. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 93-102, 2008.
- BECHER, P. et al. Molecular characterization of border disease virus, a *Pestivirus* from sheep. **Virology**, v. 198, p. 542-551, 1994.
- BECHER, P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel *Pestivirus* genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, p. 96-104, 2003.
- BOTTON, S.A. et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, n. 11, p. 1429-1438, 1998a.
- BOTTON, S.A. et al. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 84-92, 1998b.
- COLLETT, M.S. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Pestivirus* bovine viral diarrhoea virus. **Virology**, v. 165, p. 191-199, 1988.
- CORAPI, W.V. et al. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. **American Journal Veterinary Research**, v. 51, p. 1388-1394, 1990.
- DIAS, F.C. et al. Comparação dos testes de vírus neutralização contra os genótipos 1 e 2 do vírus da diarréia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) em bovinos de rebanhos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 913-920, 2010.
- FLORES, E.F. et al. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 11-17, 2000.

- FLORES, E.F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, p. 51-60, 2002.
- FLORES, E.F. et al. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.
- GIL, L.H.V.G. **Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não-estruturais de amostras do Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)**. 1998. 69f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HORZINEK, M.C. *Pestivirus*: taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, (suppl. 3), p. 1-5, 1991.
- HOWARD, C.J. et al. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 13, p. 361-369, 1987.
- KABONGO, N. et al. Molecular analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.70, n. 4, p. 273-279, 2003.
- LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE D.M.; HOWLEY P.M. **Fields Virology**. Lippincot: Williams & Wilkins, Cap. 32, p. 991-1042, 2001.
- LIU, L. et al. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of *Pestivirus* phylogeny. **Virus Research**, v. 147, p. 47-52, 2010.

MINAMI, F. et al. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, *In press*, 2009.

PELLERIN, C. 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.

RIDPATH, J.F. et al. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J.F. & BOLIN, S.R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 2, p. 101-106, 1998.

RIDPATH, J.F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, p. 127-131, 2003.

RIDPATH, J.F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 17-30, 2005.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhea virus: global status. **Veterinary Clinics Food Animals**, v. 26, p. 105-121, 2010.

RIDPATH, J.F. et al. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 184-191, 2010.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v. 5, p. 223-241, 1996.

VILCEK, S. et al. Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v. 146, n. 1, p. 99-115, 2001.

Tabela 1- Títulos^a de anticorpos neutralizantes de cada anti-soro frente aos sete isolados citopáticos do vírus da diarreia viral bovina (BVDV); e coeficiente de similaridade antigênica (R)^d entre os isolados e cepas padrão do BVDV.

Anti-soro	Vírus								
	BVDV-1					BVDV-2			
	Singer	IBSP-4	IBSP-2	M-35	VS-28	VS253	VS26/2	SV357/04	SV323/04
Singer ^b	2560 (100) ^d	2560	160	5120	1280	40	40	40	80
IBSP-4	5120 (200)	1280 (100)	2560	5120	1280	640	80	320	320
IBSP-2	640 (8,8)	640 (50)	5120 (100)	640	640	40	20	40	40
M-35	1280 (100)	640 (100)	1280 (25)	2560 (100)	640	80	20	40	80
VS-28	320 (70,7)	320 (100)	1280 (70,7)	320 (50)	320 (100)	20	20	40	40
VS253 ^c	160 (1,5)	20 (3,1)	80 (0,7)	160 (2,2)	20 (1,1)	10240 (100)	2560	1280	5120
VS26/2	160 (4,4)	160 (8,8)	20 (0,7)	160 (3,1)	160 (8,8)	640 (35,3)	1280 (100)	320	1280
SV357/04	20 (3,1)	20 (12,5)	80 (4,4)	10 (2,2)	5 (4,4)	640 (50)	320 (50)	320 (100)	640
SV323/04	20 (1,5)	80 (8,8)	10 (0,5)	80 (3,1)	40 (4,4)	80 (12,5)	80 (17,6)	640 (70,7)	2560 (100)

^aRecíproca da maior diluição do anti-soro capaz de neutralizar 100-200 DICC₅₀ (doses infectantes para 50% do cultivo celular por mL) cada um dos isolados virais.

^bCepa padrão de BVDV-1.

^cCepa padrão de BVDV-2.

^dValores de R.

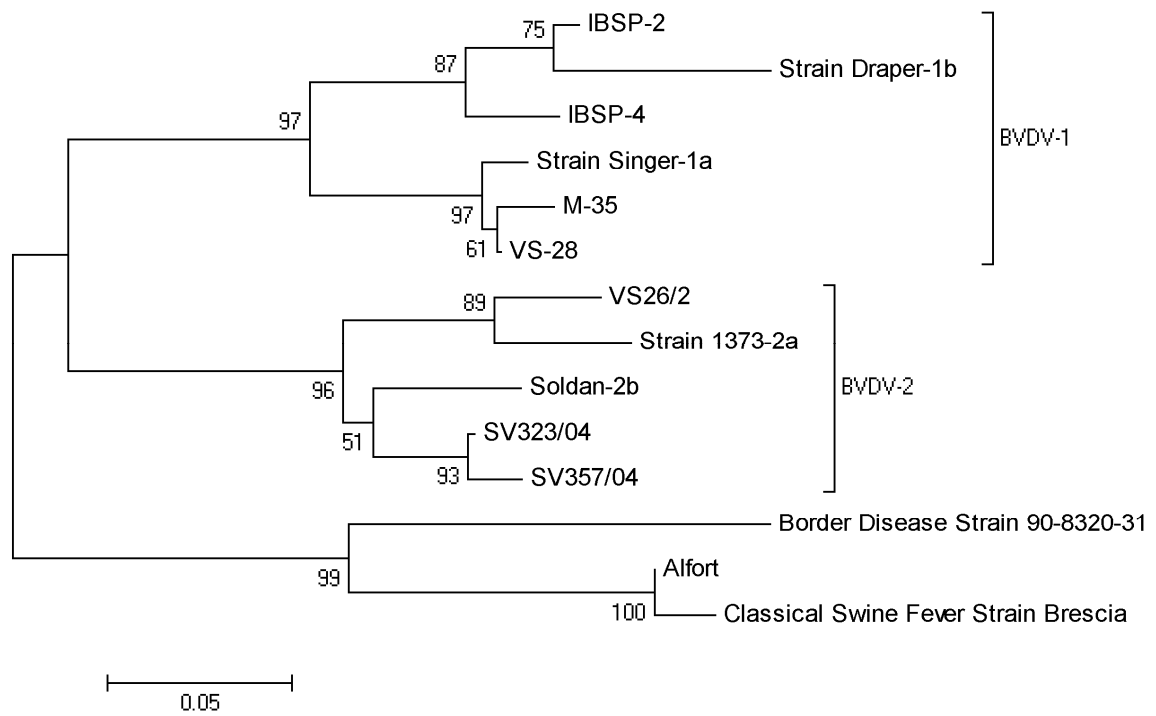


Figura 1- Árvore filogenética construída com base nas sequências de nucleotídeos da região 5'UTR de sete isolados do vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Utilizou-se o método *Neighbor - Joining* e análise *bootstrap* com 1000 réplicas, modelo *P - distance* pelo programa MEGA 5.0.

3. CAPÍTULO 2

Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul – Brasil (2000-2010).

Eloisa Bianchi¹, Mathias Martins¹, Rudi Weiblen¹ & Eduardo Furtado Flores^{1*}

(Artigo a ser submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2011)

¹Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: E.F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, CEP 97105-900. Fone/fax + (55) 55 3220-8034. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

ABSTRACT.- Bianchi E., Martins M., Weiblen R. & Flores E.F. 2010. [**Genotypic and antigenic profile of bovine viral diarrhea virus isolates from Rio Grande do Sul - Brazil (2000-2010)**]. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul - Brasil (2000-2010). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

Field isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) display a high genetic and antigenic diversity, which can difficult diagnosis and vaccine formulation. The present study characterized genetically and antigenically 20 isolates of BVDV from Rio Grande do Sul - Brazil (2000 - 2010). The isolates were associated with a variety of clinical conditions that included respiratory or gastroenteric disease, skin lesions, abortions, animals with retarded growth, and persistently infected (PI) animals. Most isolates (19 or 95%) belong to the non-cytopathic biotype (NCP), and one isolate (5%) had a mixture of viruses NCP and cytopathic (CP). Nucleotide sequencing of a region of 260 - 360 nucleotides of the untranslated 5'UTR of the viral genome followed by phylogenetic analysis identified nine isolates of BVDV-2 (45%), eight of BVDV-1 (40%) and three isolates were not classified in any genotype. It was not possible to associate genotypes or subgenotypes with clinical conditions: both BVDV-1 and BVDV-2 were involved in different clinical - pathological syndromes. Analysis of reactivity with a panel of 20 monoclonal antibodies (MAbs) revealed a marked variability in the major envelope glycoprotein (gp53/E2) among viruses of the same genotype, but especially among viruses from different genotypes. Virus neutralization assays (VN) with antisera of BVDV-1 and BVDV-2 reference strains against the isolates revealed variable levels of cross-reactivity between viruses of the same genotype, and lack or very low reactivity between viruses of different genotypes. These results indicate the presence of both

genotypes of BVDV in the cattle population of Rio Grande do Sul, and confirm the remarkable antigenic diversity these isolates.

INDEX TERMS: bovine viral diarrhea virus, BVDV, genotypes, cross neutralization.

RESUMO.- Amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) apresentam uma grande diversidade genética e antigênica, o que pode dificultar o diagnóstico e a formulação de vacinas. O presente trabalho apresenta um perfil genotípico e antigênico de 20 amostras do BVDV isoladas no Estado do Rio Grande do Sul entre 2000 e 2010. As amostras foram isoladas de uma variedade de condições clínicas, que incluíam doença respiratória ou gastroentérica aguda e crônica, lesões cutâneas, abortos, animais com crescimento retardado, além de animais persistentemente infectados. A maioria das amostras (19 ou 95%) pertence ao biótipo não-citopático (NCP); e um isolado (5%) apresentou uma mistura de vírus NCP e citopáticos (CP). O sequenciamento e análise filogenética de uma região não-traduzida e conservada (5'UTR) do genoma viral com aproximadamente 260 - 360 nucleotídeos permitiu identificar nove isolados de BVDV-2 (45%), oito isolados de BVDV-1 (40%) e três isolados BVDV atípicos. Não foi possível associar os genótipos ou subgenótipos com as condições clínicas e, tanto os BVDV-1 quanto os BVDV-2 estavam envolvidos em diferentes síndromes clínico-patológicas. Análise de reatividade com um painel de 20 anticorpos monoclonais (AcMs) contra a glicoproteína principal do envelope (gp53/E2) revelou uma variabilidade marcante nesta glicoproteína, entre vírus do mesmo genótipo, e sobretudo, entre vírus de genótipos diferentes. Testes de vírus neutralização (VN) com anti-soro de cepas de referência de BVDV-1 e BVDV-2 frente às amostras isoladas revelaram níveis variáveis de reatividade cruzada entre vírus do mesmo genótipo, e reatividade ausente ou muito baixa entre vírus de genótipos diferentes. Esses resultados

indicam a presença de ambos os genótipos do BVDV na população do RS, e confirmam a marcante variabilidade antigênica desses isolados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: vírus da diarreia viral bovina, BVDV, genótipos, neutralização cruzada.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhea virus*, BVDV) é um dos principais patógenos de bovinos, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (Horzinek 1991). Os pestivírus são vírus pequenos (40 - 60nm), envelopados e contêm uma molécula de RNA linear de fita simples e polaridade positiva como genoma (Horzinek 1991, Collett et al. 1988). O genoma do BVDV possui aproximadamente 12,3 - 12,5 kb e contém uma única fase aberta de leitura (ORF), que codifica uma poliproteína com 3988 aminoácidos (Collett et al. 1988). A ORF é precedida por uma região não traduzida (5'UTR) de aproximadamente 360 a 390 nucleotídeos. A região 5' UTR do genoma é altamente conservada entre os *Pestivirus* e tem sido frequentemente utilizada para caracterização genética e filogenia de isolados de campo (Ridpath et al. 1994). Os isolados de campo do BVDV podem ser ainda classificados em biótipos citopático (CP) e não-citopático (NCP), de acordo com a capacidade de produzir patologia em células de cultivo (Ridpath 2003).

A infecção de bovinos pelo BVDV tem sido associada com uma variedade de manifestações clínicas, que incluem desde infecções inaparentes até doença aguda fatal. Enfermidade gastroentérica aguda ou crônica, doença respiratória em bezerros, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, patologias cutâneas e imunossupressão estão entre as consequências mais frequentes da infecção (Baker 1995). O BVDV também é frequentemente

associado com perdas reprodutivas, como infertilidade temporária, retorno ao cio, mortalidade embrionária ou fetal, abortos ou mumificação, malformações fetais ou produção de bezerros fracos e inviáveis (Baker 1995).

A infecção pelo BVDV possui distribuição mundial e a prevalência de anticorpos atinge 70% a 80% dos animais, e até 80% dos rebanhos na América do Norte e países europeus. No Brasil, a infecção está amplamente distribuída em rebanhos de leite e corte, e vários relatos sorológicos, clínicos e virológicos sobre a enfermidade já foram publicados (Flores et al. 2005).

Os isolados de campo do BVDV apresentam uma grande variabilidade genética. Com base nas sequências de nucleotídeos da região 5'UTR, os isolados podem ser alocados em dois grupos ou genótipos principais, que também são antigenicamente distintos entre si: BVDV-1 e BVDV-2 (Pellerin et al. 1994, Ridpath et al. 1994). Os isolados de BVDV-1 podem ser subdivididos em 11 subgenótipos (Vilcek et al. 2001), enquanto que os vírus do genótipo BVDV-2 possuem dois subgenótipos BVDV-2a e BVDV-2b (Flores et al. 2002). Os vírus do genótipo 1 (BVDV-1) ainda representam a maioria dos isolados de campo na América do Norte, Europa e Austrália (Ridpath et al. 2010). Os vírus do genótipo BVDV-2 foram identificados há pouco mais de uma década em surtos de doença gastroentérica na América do Norte (Pellerin et al. 1994), mas encontram-se atualmente disseminados por vários continentes (Vilcek et al. 2001, Becher et al. 2003, Minami et al. 2009, Ridpath et al. 2010). Em 2004, um isolado atípico de *Pestivirus* (D32/00_'HoBi') foi identificado em uma amostra de soro fetal bovino oriunda do Brasil (Schirmer et al. 2004). O risco da introdução desses pestivírus atípicos na população bovina pelo uso de biológicos contaminados com soro fetal bovino, como vacinas, ou mesmo a importação de sêmen, podem vir a prejudicar programas de controle e erradicação do BVDV (Stahl et al. 2007).

A marcante variabilidade antigênica dos isolados de BVDV deve-se principalmente a região hipervariável localizada na glicoproteína gp53/E2, que é a mais abundante do envelope viral e está envolvida na ligação dos vírions aos receptores celulares (Donis, 1995). Essa glicoproteína é muito imunogênica e induz a produção de anticorpos neutralizantes no hospedeiro após a infecção natural ou vacinação (Donis 1995, Ridpath 2003). Essa variabilidade talvez faça parte de uma das estratégias do vírus de evadir-se dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelo hospedeiro (Donis 1995). Por meio de testes de neutralização cruzada e, também, por reatividade diferencial com anticorpos monoclonais, a variabilidade da E2 pode ser evidenciada (Ridpath 2003). Essa variabilidade ocorre entre amostras de um mesmo genótipo e, sobretudo, entre vírus de genótipos diferentes. Com isso, a reatividade sorológica entre vírus dos genótipos BVDV-1 e BVDV-2 é geralmente muito baixa (Ridpath 2003). Dessa forma a diferença antigênica possui implicações potenciais para o diagnóstico e para a formulação de vacinas (Flores et al. 2000, Ridpath 2003).

Estudos anteriores caracterizaram geneticamente amostras de campo do BVDV isoladas no Brasil, demonstrando a presença de vírus dos dois genótipos (Canal et al. 1998, Gil 1998, Flores et al. 2002, 2005, Cortez et al. 2006). Não obstante, a caracterização contínua de isolados é importante para o conhecimento do perfil dos vírus presentes, e também para a eventual identificação de outros genótipos ou subgenótipos circulantes. Assim, o presente artigo relata a tipificação genética de 20 amostras do BVDV isoladas no Rio Grande do Sul entre 2000 e 2010, por meio de sequenciamento, seguido de análise filogenética de uma sequência da região 5' UTR. Também foram investigadas a reatividade desses isolados com um painel de anticorpos monoclonais (AcMs), e a sua reatividade sorológica com anti-soro produzido contra vírus dos genótipos BVDV-1 e BVDV-2.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Vinte amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas de diversas formas clínicas da doença no estado do Rio Grande do Sul durante o período de 2000 a 2010 foram caracterizadas. As amostras foram sequenciadas e a análise filogenética da região 5'UTR do genoma serviu para a construção de uma árvore filogenética. A seguir realizou-se a caracterização antigênica pela reatividade com anticorpos monoclonais (AcMs) por imunofluorescência indireta (IFA) e por neutralização cruzada (VN), utilizando-se soro produzido contra cepas de referência e isolados brasileiros dos BVDV-1 e 2.

Células e isolamento viral

O isolamento das amostras foi realizado em células da linhagem de rim bovino (“*Madin – Darby bovine Kidney*” – MDBK), livres de *Pestivirus* cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), suplementado com 10% de soro equino, estreptomicina^a (0,4mg por mL), penicilina^a (1,6mg por mL) e anfotericina B^a (0,0025mg por mL). A identificação dos isolados foi realizada por imunofluorescência indireta (IFA) utilizando-se uma mistura de AcMs produzidos contra os dois genótipos do vírus como anticorpo primário, e um anticorpo secundário (anti-mouse IgG) conjugado com FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA). As amostras positivas foram identificadas e amplificadas em células MDBK para posterior caracterização.

Extração de RNA e RT-PCR

Células MDBK foram infectadas com cada amostra viral clonada, individualmente, em frascos de 25cm² e após 24 – 48 horas, o RNA total foi extraído das células, utilizando-se

o reagente Trizol^b, de acordo com instruções do fabricante e eluído em água ultra-pura tratada com DEPC^a (*Diethyl-pyrocabonate*) sendo então estocado a -80°C. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total utilizando um *Kit* comercial *SuperScriptTM III RT^b*, o qual serviu de molde para a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada de acordo com as condições e utilizando os *primers* descritos por Ridpath & Bolin (1998). A reação resulta na amplificação de fragmento de 270 pb localizado na região 5'UTR do genoma viral, visualizado em gel de agarose 1,2% em aparelho de transluminescência.

Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos da amplificação por PCR foram purificados com o uso do *Kit* comercial PCR *PureLink^b* e sequenciados em duplicata pelo aparelho MEGABACE 500. A pureza das sequências foi avaliada pelo programa *Staden Package* (Staden 1996), sendo então alinhadas para a obtenção de uma sequência consenso e posteriormente submetidas ao BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para comparação com sequências depositadas no *GenBank*, classificando os isolados em dois genótipos. O alinhamento e a edição das sequências realizados pelo BioEdit (Hall 1999) e a construção da árvore filogenética dos isolados, cepas padrão do BVDV, e cepas de referência para outros pestivirus foi realizada utilizando o programa MEGA 5.0 pelo método *Neighbor - Joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*, modelo *P-distance*.

Reatividade com anticorpos monoclonais (AcMs)

Um painel com 20 AcMs específicos contra a glicoproteína do envelope gp53/E2 do BVDV-1 (Corapi et al. 1990) e BVDV-2 (Ridpath et al. 2000) foram utilizados. Frascos de 25 cm² com células MDBK foram infectados com cada isolado. Após um período de 72 horas os tapetes celulares foram tripsinizados, ressuspensos e depositados sobre lâminas *multispot*.

Após, as células foram fixadas em acetona e submetidas a imunofluorescência indireta (IFA), de acordo com (Botton et al. 1998b). Utilizaram-se os AcMs individuais como anticorpo primário e um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, USA). Células MDBK infectadas com cepas padrão, e células não infectadas, foram utilizadas como controles.

Produção do anti-soro

O anti-soro contra cepas de referência para os genótipo 1 e 2 (Singer e VS253) e também para dois isolados brasileiros (IBSP-2 e VS26/2) foram produzidos em bezerros soronegativos para o BVDV. Cada animal recebeu uma injeção intramuscular com o sobrenadante de cultivo de células infectadas, contendo aproximadamente $10^{7,0}$ DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos por mL) do respectivo vírus. Aos 30 dias pós-inoculação, o sangue foi coletado para obtenção do soro e inativado pelo calor a 56°C por 30 minutos para posterior uso nos testes de neutralização.

Vírus neutralização cruzada

Para avaliar a reatividade sorológica cruzada, o anti-soro produzido contra as cepas de referência e isolados brasileiros foram ajustados inicialmente a um título neutralizante de 80/160 contra o respectivo vírus homólogo. A seguir os anti-soro foram testados frente aos 20 isolados de campo. Os testes de neutralização viral (VN) foram realizados em microplacas de poliestireno de acordo com protocolos-padrão (Botton et al. 1998a) com algumas modificações. Foram testadas diluições crescentes partindo de 1:5 até 10.240 de cada anti-soro, frente a doses constantes 100-200 DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares), de cada amostra viral, em duplicata. A leitura foi realizada após 96h de incubação, submetendo-se os tapetes celulares à técnica de imunoperoxidase (IPX) de acordo com Botton

et al. (1998b). Considerou-se o título de anticorpos neutralizantes a recíproca da maior diluição de soro capaz de prevenir a replicação viral.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A origem, o histórico clínico - patológico e o biótipo das amostras analisadas no presente estudo estão apresentados no Quadro 1. As amostras foram isoladas de uma variedade de condições clínicas, já bem documentadas como conseqüências da infecção pelo BVDV (Baker 1995). Dezenove amostras isoladas (95%) pertencem ao biótipo NCP e uma amostra (5%) continha uma mistura de vírus CP e NCP.

Não foi possível associar as diferentes formas clínicas da doença com o genótipo e subgenótipo de cada isolado. Ambos BVDV-1 e BVDV-2 estavam envolvidos nas diferentes síndromes clínicas. Inicialmente os vírus do genótipo BVDV-2 foram identificados em surtos de doença hemorrágica severa (Corapi et al. 1989), e por muitos anos considerados sinônimo de alta virulência. No entanto, vírus deste genótipo têm sido subsequentemente associados com as mesmas manifestações clínicas historicamente atribuídas ao BVDV-1, sem relação especial com virulência (Ridpath et al. 2010).

A proporção de amostras NCP e CP isoladas no presente estudo reflete, em parte, a abundância relativa de vírus desses biótipos na natureza. A maioria das amostras que circulam a campo e que estão associadas com uma grande variedade de condições clínicas é de vírus do biótipo NCP (Ridpath 2003, 2005).

A sequência de nucleotídeos da região 5'UTR foi determinada após a amplificação por RT-PCR, sendo que os produtos da amplificação apresentaram um tamanho aproximadamente de 260-270 pb. Os amplicons das amostras de BVDV foram sequenciados, analisados e então classificados dentro de genótipos e subgenótipos. A árvore filogenética apresentada na Fig. 1, possibilitou a identificação três grupos distintos. Dos isolados analisados, nove ou 45% foram

classificados no genótipo BVDV-2, sendo as amostras (SV728/02, SV11/03, SV56/03, SV432/05, SV193/08, SV275/08, SV778/09) pertencentes ao subgenótipo 2b e as amostras SV154/08 e SV284/08 ao subgenótipo 2a. Outras oito ou (40%) foram classificadas como genótipo BVDV-1 (SV663/00, SV216/02, SV132/04, SV278/04, SV108/05, SV66/07 e SV436/08), pertencentes ao subgenótipo 1a e o SV163/01 pertencente ao subgenótipo 1b. Outros três isolados (SV713/09, SV241/10 e SV311/10) apresentaram grande similaridade genética com o grupo de *Pestivirus* atípicos de origem bovina (Fig. 1). Essa classificação, no entanto, é provisória sugere-se o estudo de outras sequências de regiões do genoma para confirmar a sua classificação.

Alguns estudos anteriores já haviam realizado a caracterização genética e antigênica de amostras de BVDV isoladas no Brasil. Canal et al. (1998) foram pioneiros na caracterização genotípica de isolados brasileiros, identificando a presença de ambos os genótipos BVDV-1 e BVDV-2 entre os isolados no país. Analisando 18 isolados provenientes dos Estados de São Paulo, Santa Catarina e RS. Gil (1998) realizou uma análise filogenética com 21 isolados, identificando 17 isolados de BVDV-1 e quatro de BVDV-2. Complementando estes estudos, Flores et al. (2002) analisaram as regiões 5'UTR e NS2/3 de amostras de BVDV, e verificaram que alguns isolados brasileiros de BVDV-2 agrupavam-se filogeneticamente distantes de isolados da Europa, Estados Unidos e Austrália, propondo a classificação de BVDV-2 em subgenótipos (BVDV-2a e BVDV-2b), que foi adotada a partir de então. Cortez et al. (2006) analisaram 19 isolados de BVDV provenientes de várias regiões do Brasil, incluindo nove amostras oriundas do Rio Grande do Sul, dentre estas, seis (66,6%) eram BVDV-1, três isolados (33,3%) eram BVDV-2. Duas das 19 amostras analisadas foram identificadas como pestivírus atípico. Estes estudos basearam-se no estudo da região 5' UTR do genoma, e analisaram um número restrito de isolados identificando assim um maior número de isolados do genótipo tipo 1.

O número crescente de isolamentos, a grande diversidade dos vírus de campo, assim como o surgimento de pestivírus atípicos (Schirrmeyer et al. 2004, Stalder et al. 2005), justificam o monitoramento contínuo das características genéticas e antigênicas do vírus do BVDV circulantes na população bovina. Além do conhecimento acerca dos genótipos presentes e mais prevalentes, as informações obtidas com o monitoramento sistemático permitem reavaliações periódicas dos procedimentos de diagnóstico (cepas virais a serem utilizadas nos testes de VN, por exemplo) e da composição viral mais adequada das vacinas (Fulton et al. 2003, Ridpath 2003, 2005, Ridpath et al. 2010). A análise genética contínua de isolados de campo também permite a identificação da distribuição temporal e espacial dos genótipos, de sua associação com diferentes síndromes clínicas e/ou a detecção da introdução de novos genótipos ou subgenótipos na população (Ridpath et al. 2010). Nesse sentido, a recente identificação de pestivírus atípicos pode tornar a epidemiologia e as estratégias de diagnóstico e controle do BVDV ainda mais complexas (Ridpath et al. 2010).

O presente estudo enfatizou a caracterização genotípica de amostras de BVDV isoladas de uma população bovina geograficamente bem delimitada, a do Rio Grande do Sul. Em especial, os resultados obtidos indicam uma maior frequência de BVDV-2 comparados com estudos anteriores. É importante ressaltar que este estudo envolveu uma amostragem restrita, podendo não refletir a proporção real de BVDV-1 e BVDV-2 que circulam na população bovina do RS. Segundo Ridpath (2010), é difícil precisar o número de amostras virais necessárias para se obter uma idéia aproximada da proporção relativa de genótipos e subgenótipos circulantes, mas um número mínimo de 50 isolados pode ser tomado como referência. Assim, os resultados aqui apresentados confirmam a presença de vírus dos dois genótipos na população bovina do RS, e indicam um crescimento BVDV-2 em relação ao BVDV-1, mas estes resultados devem ser interpretados com cautela, pois podem não refletir a real proporção dos dois genótipos presentes em outras regiões.

Os vírus do genótipo BVDV-2 foram identificados pela primeira vez há mais de duas décadas em surtos de doença gastroentérica severa na América do Norte e, por isso, foram inicialmente considerados agentes novos (Corapi et al. 1989, Pellerin et al. 1994). Entretanto, acredita-se atualmente que os BVDV-2 circulem há muito tempo. Os vírus desse genótipo, que representam aproximadamente 50% dos BVDV isolados nos Estados Unidos, foram retrospectivamente identificados há mais de 40 anos, e o número de isolados de BVDV-2 tem aumentado nos últimos anos em vários países, mas a maioria apresenta baixa virulência (Ridpath et al. 2010). Em alguns estudos, a proporção de BVDV-1 e BVDV-2 circulantes varia de acordo com a região estudada. Por exemplo, no Japão, Minami et al. (2009) encontraram maior prevalência do genótipo 1, situação semelhante foi encontrada na Austrália e nos EUA (Ridpath et al. 2010).

As sequências de nucleotídeos da região 5'UTR do genoma viral tem sido muito utilizadas para a classificação genotípica de isolados do BVDV, pelo fato de esta região ser altamente conservada entre os *Pestivirus* (Pellerin et al. 1994, Ridpath et al. 2000). Grupos de isolados classificados em genótipos BVDV-1 e BVDV-2 de acordo com a 5'UTR são antigenicamente distintos entre si, refletindo obviamente a existência de diferenças concomitantes em proteínas de superfície (Pellerin et al. 1994, Ridpath et al. 1994, 2010). Devido às diferenças genéticas existentes também entre os isolados de um mesmo genótipo, estudos mais recentes têm refinado essas análises. A análise concomitante da região 5'UTR com outros genes, como a N^{pro}, E2 e NS3 tem permitido classificar os isolados em subgrupos ou subgenótipos (Vilcek et al. 2001, Flores et al. 2002, Liu et al. 2010). No entanto, as classificações em subgenótipos/subtipos nem sempre refletem diferenças evidentes em aspectos antigênicos, epidemiológicos ou patológicos, possuindo por isso um significado prático questionável (Ridpath et al. 2010).

Além da variabilidade antigênica entre vírus de um mesmo genótipo, isolados de BVDV de genótipos diferentes são antigenicamente mais distintos entre si (Pellerin et al. 1994, Ridpath et al. 1994). Para analisar a variabilidade antigênica das amostras estudadas, inicialmente investigou-se a sua reatividade com um painel de AcMs específicos contra a glicoproteína gp53/E2. Parte desses AcMs foi produzida com uma cepa de BVDV-1 (Corapi et al. 1990) e parte com uma cepa de BVDV-2 (Ridpath et al. 2000). O perfil de reatividade dos AcMs com as amostras virais no teste de IFA está apresentado no Quadro 2. Em geral, os AcMs foram capazes de reconhecer e ligar-se aos antígenos virais de cada isolado. Pode-se observar que as amostras analisadas apresentaram perfis de reconhecimento variável, sendo esta uma característica da região da glicoproteína gp53/E2, proteína contra a qual os anticorpos foram produzidos (Corapi et al. 1990, Ridpath et al. 2000). O reconhecimento de três amostras de pestivirus atípicos apresentaram perfis semelhantes de reconhecimento entre si, por seis AcMs. Os isolados pertencentes ao grupo BVDV-1 também apresentaram um perfil de reconhecimento similar entre si, comparando-se com o vírus padrão Singer. Já os isolados do genótipo BVDV-2 apresentaram um perfil variado, sendo reconhecidos por vários AcMs. O isolado SV193/08 foi reconhecido pelo maior número de AcMs (11 AcMs) sendo o anticorpo BZ-36 foi o que reconheceu o maior número de isolados (17).

A caracterização pela reatividade com o painel de AcMs confirma a existência de uma grande diversidade antigênica entre as amostras locais de BVDV. Embora muito utilizada para avaliar o grau de variabilidade antigênica, o perfil de reatividade antigênica é subjetivo, pois reflete o reconhecimento e ligação dos AcMs com alguns epítomos. A glicoproteína p53/E2 está submetida à intensa pressão de seleção, que acaba resultando em mutações e seleção de variantes antigenicamente diferentes (Corapi et al. 1990, Donis 1995). AcMs que possuem capacidade de reconhecer grande número de isolados, assim como o BZ-36,

possuem grande utilidade para o diagnóstico, devido a reação com a maioria das amostras de campo.

A seguir, investigou-se o grau de reatividade sorológica cruzada de anti-soro de cepas de referência e isolados de BVDV-1 e BVDV-2 com as amostras isoladas (Fig. 2). Pode-se observar que os anti-soro (Singer, IBSP-2, VS253, VS26/2) – com títulos neutralizantes ajustados a 80/160 contra os vírus homólogos – apresentaram reatividade variável contra amostras do mesmo genótipo, porém falharam em neutralizar grande parte das amostras do outro genótipo. Em especial, o soro produzido contra o BVDV-2 (VS26/2) foi que reagiu com um número maior de isolados de ambos os genótipos. A grande variabilidade antigênica entre isolados do BVDV e, principalmente, a baixa reatividade sorológica entre vírus de genótipos diferentes tem sido motivo de preocupação, sobretudo pelas implicações afetando nos resultados dos testes sorológicos e para a formulação de vacinas (Fulton et al. 2003, Ridpath 2003, 2005, Ridpath et al. 2010). Por essa razão, vacinas a serem utilizadas em populações bovinas em que os vírus dos dois genótipos circulem devem necessariamente conter tanto o BVDV-1 quanto BVDV-2 (Ridpath 2003, 2005, Ridpath et al. 2010). Mesmo a inclusão concomitante de vírus de diferentes subgenótipos (BVDV-1a, 1b; BVDV 2a, 2b) pode ser necessária para induzir boa proteção clínica (Ridpath et al. 2010). A caracterização molecular e antigênica de vírus circulantes em determinadas regiões permite que se conheçam os genótipos presentes e, assim, pode direcionar a composição das vacinas (Ridpath et al. 2010). No entanto, essa estratégia tem sido negligenciada à medida que grandes laboratórios absorvem laboratórios regionais e tendem a formular vacinas com cepas de referência, em detrimento do uso de amostras locais (Ridpath et al. 2010).

A constatação da circulação de vírus dos dois genótipos no Brasil já resultou na inclusão de cepas de BVDV-2 (além de BVDV-1 já presentes na maioria das vacinas) em grande parte das vacinas comercializadas no país, sejam elas importadas ou produzidas por

laboratórios nacionais (Flores et al. 2005). Não obstante, a inclusão de amostras mais representativas da população viral circulante na população bovina - e que apresentem um espectro mais amplo de reatividade - pode contribuir para uma maior eficácia das vacinas contra o BVDV. Nesse sentido, e a exemplo do que tem sido realizado em outros países, estudos mais abrangentes e detalhados sobre as características antigênicas dos vírus circulantes podem direcionar a formulação de vacinas mais protetoras.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a predominância de isolados NCP, a circulação de BVDV-1 e BVDV-2 na população estudada e, principalmente, a presença de *Pestivirus* atípicos na população bovina do RS. Além disso, confirmam a grande variabilidade genética e antigênica do BVDV e a necessidade de contínuo monitoramento para a eventual identificação de novos genótipos e/ou subgenótipos que possam influenciar no diagnóstico e/ou na formulação de vacinas.

FONTES DE AQUISIÇÃO

a- Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, USA.

b- Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA

REFERÊNCIAS

Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea virus infection. *Vet. Clin. North Am.* 11(3): 425-445.

Becher P., Avalos-Ramirez R., Orlich M., Cedillo Rosales S., König M., Schweizer M., Stalder H., Schirmer H. & Thiel H.J. 2003. Genetic and antigenic characterization of novel *Pestivirus* genotypes: implications for classification. *Virology.* 311:96-104.

Botton S. A., Silva A. M., Brum M. C. S., Flores E. F. & Weiblen R. 1998a. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31(11): 1429-1438.

- Botton S. A., Gil L.H.V.G., Silva A. M., Flores E.F., Weiblen R., Pituco M.E., Roehe P.M., Moojen V. & Wendelstein A.C. 1998b. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18(2):84-92.
- Canal C.W., Strasser M., Hertig C., Masuda A. & Peterhans E. 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63:85-97.
- Collett M.S., Larson R., Gold C., Strick D., Dennis K., Anderson D.K. & Purchio A.F. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Pestivirus* bovine viral diarrhoea virus. *Virology.* 165(1):191-199.
- Corapi W.V., French T.W. & Dubovi E.J. 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with non cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 62:2823-2827.
- Corapi W.V., Donis R.O. & Dubovi E.J. 1990. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 51:1388-1394.
- Cortez A., Heinemann M. B., Castro A. M. M. G., Soares R. M., Pinto A. M. V., Alfieri A. A., Flores E. F., Leite R. C. & Richtzenhain, L. J. 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesq. Vet. Bras.* 26(4): 211-216.
- Donis, R. O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am.* 11(3): 393-423.
- Flores E.F., Weiblen R., Gil L.H.V.G., Tobias F.L., Lima M., Garcez D.C. & Botton S.A. 2000. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarreia bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52(1):11-17.
- Flores E.F., Ridpath J.F., Weiblen R., Vogel F.S.F. & Gil L.H.V.G. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87:51-60.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehe P.M., Alfieri A.A. & Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25:125-134.
- Fulton R.W., Ridpath J.F., Confer A.W., Saliki J.T. Burge L.T. & Payton M.E. 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biol.* 31:89-95.
- GIL L.H.V.G. 1998. Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não-estruturais de amostras do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS. 69p.

- Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 1999. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-98.
- Horzinek M.C. 1991. *Pestivirus*: taxonomic perspectives. Arch. Virol. (suppl, 3):1-5.
- Liu L., Xia H., Baule C., Belák S. & Wahlberg N. 2010. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of *Pestivirus* phylogeny. V. Res. 147:47-52.
- Minami F., Makoto N., Mika I., Tatsuhiko M., Hikaru T., Yoshiko J., Takeshi S., Michiko H., Yoshihisa S., Yoshihiro S., Katsuaki S. & Hiroomi A. 2009. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhea virus subgenotypes. Comp. Imm. Microbiol. Infect. Dis. *In press*.
- Pellerin C., Hurk J., van den Lecomte J. & Tussen P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology. 203(2):260-268.
- Ridpath J.F., Bolin S.R. & Dubovi E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. Virol. 206(1):66-74.
- Ridpath J.F. & Bolin S.R. 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. Mol. Cell. Probes. 12(2):101-106.
- Ridpath J.F., Neill J.D., Frey M. & Landgraf J.G. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. Vet. Microbiol. 77:145-155.
- Ridpath J.F. 2003. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. Biol. 31:127-131.
- Ridpath J.F. 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. Prev. Vet. Med. 72(1-2):17-30.
- Ridpath J.F. 2010. Bovine viral diarrhea virus: global status. Vet. Clin. Food Anim. 26:105-121.
- Ridpath J.F., Fulton R.W., Kirkland P.D. & Neill J.D. 2010. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. J. Vet. Diagn. Invest. 22:184-191.
- Schirrmeier H., Strebelow G., Depner K., Hoffman B. & Beer M. 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical *Pestivirus* isolate, a putative member of a novel *Pestivirus* species. J. Gen. Virol. 85:3647-3652.
- Staden, R. The Staden sequence analysis package. 1996. Molecular Biotechnology. 5:223-241.
- Stahl K., Kampa J., Alenius S., Persson A.W., Baule C., Aiumlamai S. & Belák S. 2007. Natural infection of cattle with an atypical "Hobi"-like pestivirus-implications for BVD control and for the safety of biological products. Vet. Res. 38:517-523.

Stalder H.P., Meier P., Pfaffen G., Wageck-Canal C., Rufenacht J., Schaller P., Bachofen C., Marti S., Vogt H.R. & Peterhans E. 2005. Genetic heterogeneity of pestivirus of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72(1-2):37-41.

Vilcek S., Paton D.J., Durkovic B., Strojny L., Ibata G., Moussa A., Loitsch A., Rossmanith W., Veja S., Scicluna M.T. & Palfi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146(1):99-115.

Quadro 1. Identificação, origem, biotipo (não-citopatogênico: NCP e citopatogênico: CP) e genótipo das amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas no Rio Grande do Sul – Brasil (2000 – 2010).

Identificação	Biotipo	Histórico	Material	Genótipo	Local	Ano
SV 663/00	NCP	Bezerro com crescimento retardado, sinais respiratórios recorrentes	Suabe nasal	1a	Tapejara	2000
SV 163/01	NCP	Doença respiratória, reprodutiva e digestiva	Pulmão, fígado, coração e baço	1b	Arroio dos Ratos	2001
SV 216/02	NCP	Bezerro com diarreia, ulcerações no trato digestivo	Leucócitos, baço, pulmão e intestino	1a	São Gabriel	2002
SV 132/04	NCP	Propriedade com abortos (11/100) em fases diversas da gestação	Cérebro, timo, coração, pulmão, fígado e baço	1a	São Martinho da Serra	2004
SV 278/04	NCP	Feto abortado	Cérebro	1a	São Vicente do Sul	2004
SV 108/05	NCP	Animal positivo no teste da orelha por imunistoquímica (IPX)	Leucócitos e tecidos	1a	Encruzilhada do Sul	2005
SV 66/07	NCP/CP	Bezerros, doença gastroentérica, suspeita de animal persistentemente infectado (PI)	Leucócitos	1a	Bagé	2007
SV 436/08	NCP	Bezerros cegos	Baço, pulmão e linfonodos	1a	Porto Alegre	2008
SV 728/02	NCP	Bezerro PI, assintomático, propriedade com problemas reprodutivos	Leucócitos e tecidos	2b	Porto Alegre	2002
SV 11/03	NCP	Gastroenterites	Leucócitos e tecidos	2b	Cruz Alta	2003
SV 432/05	NCP	Não consta	Não consta	2b	Não consta	2005
SV 56/03	NCP	Crescimento retardado com quadros de diarreia	Leucócitos e fezes	2b	São Gabriel	2006
SV 154/08	NCP	Fazenda com animais positivos no teste da orelha por (IPX)	Leucócitos	2a	Porto Alegre	2008
SV 193/08	NCP	Animal positivo no teste da orelha por (IPX)	Leucócitos	2b	Porto Alegre	2008
SV 275/08	NCP	Propriedade com problemas reprodutivos, abortos, triagem de PIs	Leucócitos	2b	Nova Esperança do Sul	2008
SV 284/08	NCP	Animal positivo no teste da orelha por (IPX)	Timo, baço, pulmão e linfonodos	2a	Porto Alegre	2008
SV 778/09	NCP	Problemas reprodutivos	Leucócitos	2b	Alegrete	2009
SV 713/09	NCP	Má formação fetal	Sêmen	Atípico	Porto Alegre	2009*
SV 241/10	NCP	Problemas reprodutivos	Leucócitos	Atípico	Caçapava do Sul	2010
SV 311/10	NCP	Problemas reprodutivos	Pulmão e baço	Atípico	Santa Maria	2010

* Ano em que a amostra foi enviada ao Setor de Virologia para diagnóstico viral.

Quadro 2. Reatividade de anticorpos monoclonais (AcMs) específicos contra a gp53/E2 com amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas no Rio Grande do Sul (2000 a 2010).

Isolado	AcMs																		
	Oligoclonal	BVDV-1 ^a								BVDV-2 ^b									
	19F7	18D4	20G7	6D11	27B3	26C6	F11/4D8	10F9	7.1.8	BZ-36 ^b	BZ-34 ^b	BZ-75	BZ-55	BZ-74	BZ-71	BZ-67	BZ-60	BZ-77	BZ-73
Singer	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●								
SV663/00	●	●	●	●		●				●	●								
SV163/01	●	●	●		●	●	●		●	●	●								
SV216/02	●	●	●		●	●	●		●	●									
BVDV-1 SV132/04	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●								
SV278/04	●	●		●		●	●	●		●	●								
SV108/05	●	●	●	●	●		●		●	●									
SV66/07	●	●		●						●	●								
SV436/08	●				●		●	●			●		●		●	●		●	
VS253	●									●	●	●	●		●			●	●
SV728/02	●	●							●	●	●	●	●	●					●
SV11/03	●			●					●	●		●	●	●	●	●			●
SV56/03	●				●		●					●	●						
BVDV-2 SV432/05	●	●							●	●	●	●	●						
SV154/08	●			●			●			●		●	●	●					
SV193/08	●									●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
SV275/08	●											●							
SV284/08	●								●	●		●	●	●					●
SV778/09	●								●	●	●								
SV713/09	●									●	●			●		●	●		
Atípicos SV241/10	●									●									
SV311/10	●								●	●	●								

^a Corapi et al. 1990.

^b Ridpath et al. 2000.

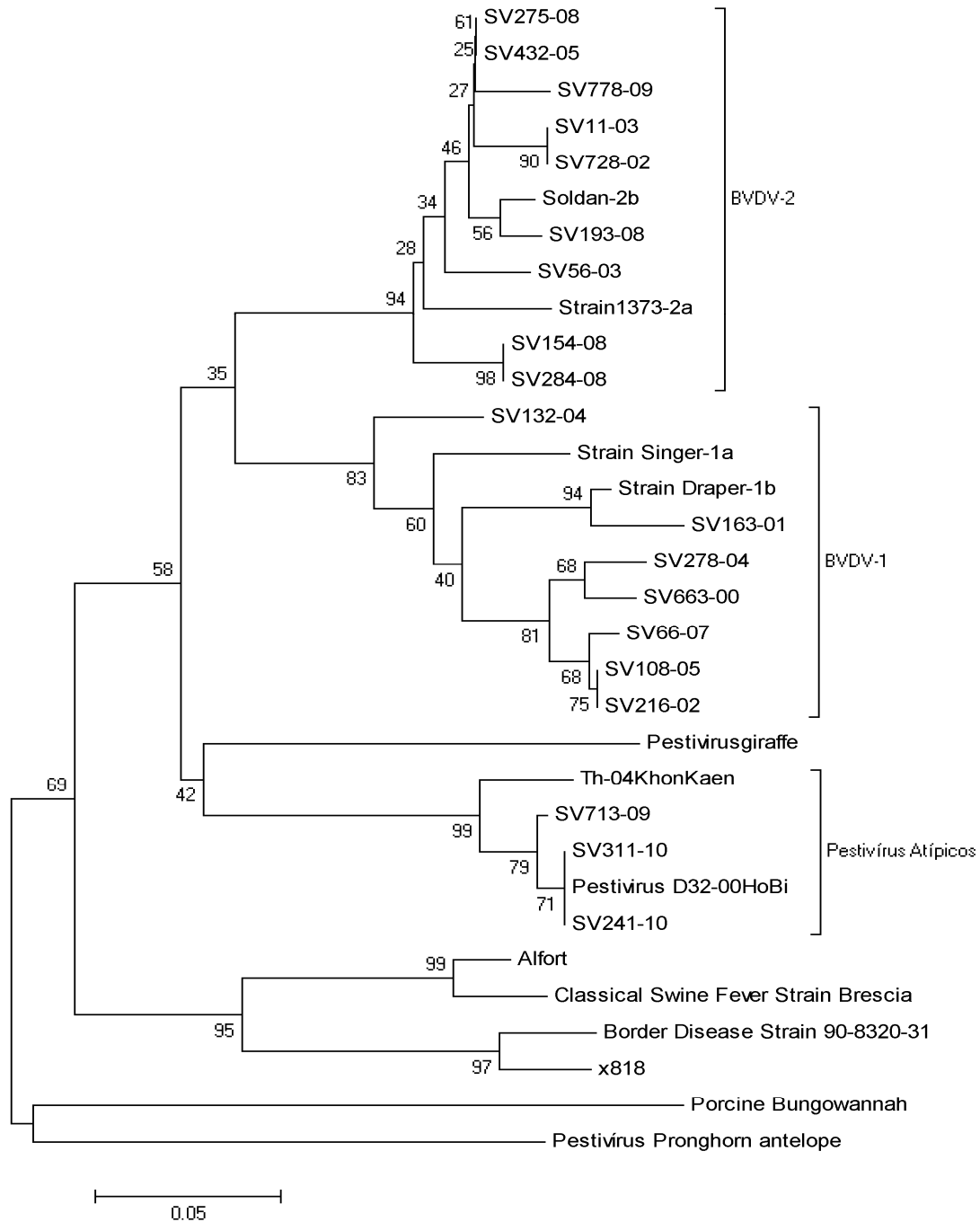


Fig. 1: Árvore filogenética construída com base nas seqüências de nucleotídeos da região 5'UTR de 20 isolados do vírus da diarréia viral bovina. Utilizou-se o método *Neighbor - Joining* e análise *bootstrap* com 1000 réplicas, modelo *P - distance* pelo programa MEGA 5.0. O SV436/08 não foi incluído na construção da árvore filogenética devido a problemas com a seqüência de nucleotídeos.

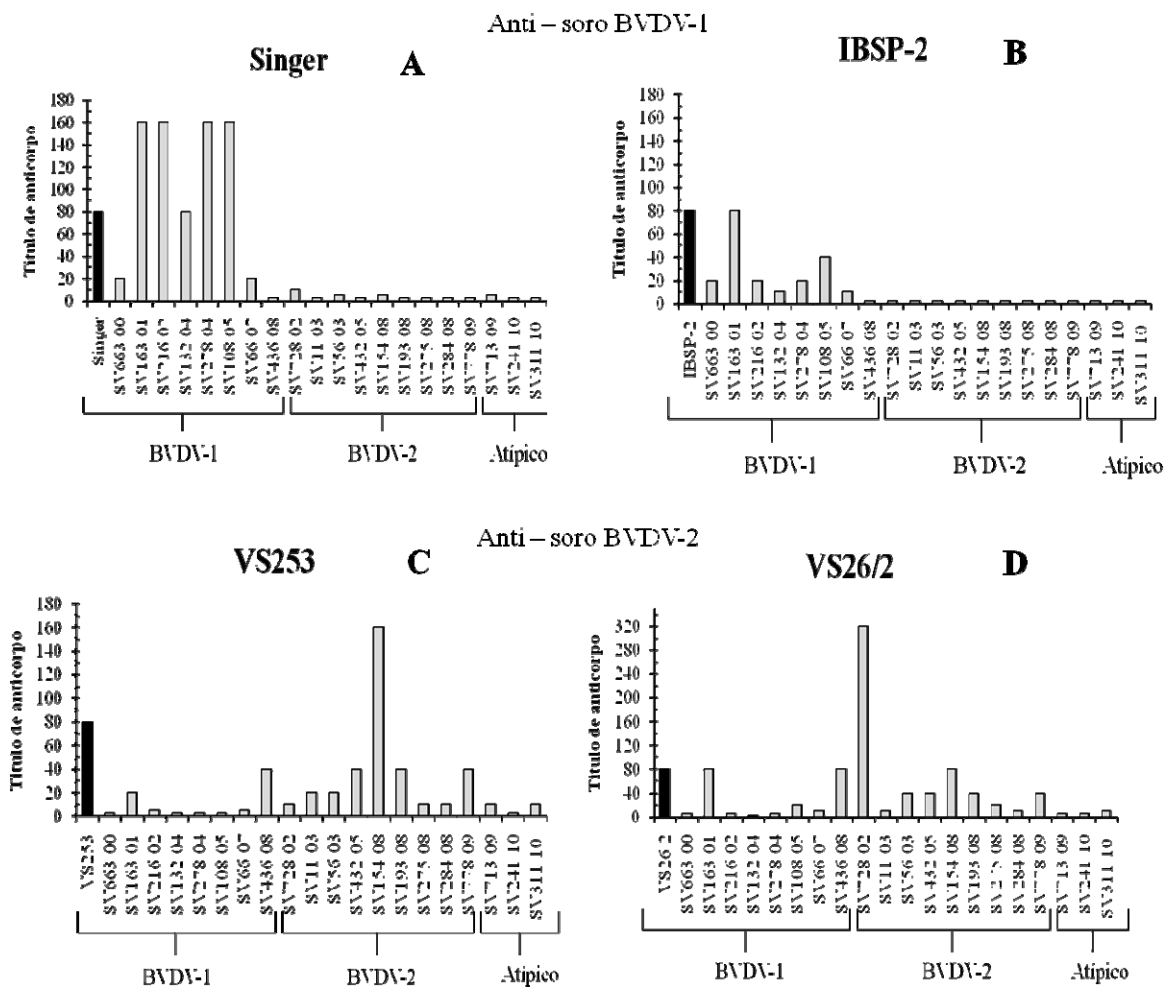


Fig. 2: Títulos de anticorpos neutralizantes de anti-soro produzido contra cepas de referência e contra dois isolados brasileiros do vírus da diarréia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) frente a 20 isolados do BVDV. As barras em negro representam os títulos neutralizantes contra o vírus homólogo, e as barras em branco contra os vírus heterólogos.

4. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- Dentre as cepas analisadas, as cepas IBSP-4 e VS26/2 são as mais indicadas para uso em formulações vacinais;
- Apesar das diferenças antigênicas entre os genótipos, não há a necessidade de incluir-se vírus dos dois genótipos, ou cepas locais, nos testes de VN realizados para monitoramento de rebanhos e/ou estudos soro-epidemiológicos;
- Vírus dos dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2), além de pestivirus atípicos, foram identificados na população bovina do RS;
- Os isolados de BVDV do RS apresentam uma marcante variabilidade genética e antigênica.

5. REFERÊNCIAS

AVALOS-RAMIREZ, R. et al. Evidence for the presence of two novel *Pestivirus* species. **Virology**, v. 286, p. 456-465, 2001.

BACHOFEN, C. et al. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Veterinary Microbiology**. v. 131, n. 1-2, p. 93-102, 2008.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BECHER, P. et al. Molecular characterization of border disease virus, a *Pestivirus* from sheep. **Virology**, v. 198, p. 542-551, 1994.

BECHER, P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel *Pestivirus* genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, p. 96-104, 2003.

BOLIN, S. Control of bovine viral diarrhoea virus infection by use of vaccination. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 615-626, 1995.

BOTTON, S. A. et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, n. 11, p. 1429-1438, 1998a.

BOTTON, S. A. et al. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 84-92, 1998b.

CANAL, C. W. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 85-97. 1998.

COLLETT, M. S. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Pestivirus* bovine viral diarrhoea virus. **Virology**, v. 165, p. 191-199, 1988.

CORAPI, W. V. et al. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with non cytopathic bovine viral diarrhea virus. **Journal Virology**, v. 62, p. 2823-2827, 1989.

CORAPI, W.V. et al. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. **American Journal Veterinary Research**, v. 51, p. 1388-1394, 1990.

CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006.

DIAS, F. C. et al. Comparação dos testes de vírus neutralização contra os genótipos 1 e 2 do vírus da diarréia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) em bovinos de rebanhos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 913-920, 2010.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics North America**, v. 11, n. 3, p. 393-423, 1995.

DUBOVI, E. J. Genetic diversity and BVD virus. **Compendium of Immunology and Microbiology of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 155-162, 1992.

FLORES, E. F. et al. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 11-17, 2000.

FLORES, E. F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, p. 51-60, 2002.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FULTON, R. W. & BURGE, L. J. Bovine viral diarrhea virus types 1 ad 2 response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 264-274, 2001.

FULTON, R. W. et al. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, v. 31, p. 89-95, 2003.

GIL, L. H. V. G. Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não-estruturais de amostras do Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, p. 69, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HORZINEK, M.C. *Pestivirus*: taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, (suppl. 3), p. 1-5, 1991.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America**, v. 11, n. 3, p. 521-548, 1995.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 89-107, 1999.

HOUE, H., LINDBERG, A. et al. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 427-436, 2006.

HOWARD, C. J. et al. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 13, p. 361-369, 1987.

KABONGO, N. et al. Molecular analysis of bovine viral diarrhea virus isolates from South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.70, n. 4, p. 273-279, 2003.

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE D.M.; HOWLEY P.M. **Fields Virology**. Lippincot: Williams & Wilkins, Cap. 32, p. 991-1042, 2001.

LIU, L. et al. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of *Pestivirus* phylogeny. **Virus Research**, v. 147, p. 47-52, 2010.

McCLURKIN, A. W. et al. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 156-161, 1984.

MINAMI, F. et al. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, *In press*, 2009.

OLIVEIRA, E. A. S. Caracterização antigênica de amostras de vírus da diarréia viral bovina com anticorpos monoclonais. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 59, 1996.

PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 260-268, 1994.

RIDPATH, J. F. et al. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J. F. & BOLIN, S. R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 2, p. 101-106, 1998.

RIDPATH, J. F. et al. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 145-155, 2000.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, p. 127-131, 2003.

RIDPATH, J. F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 17-30, 2005.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Veterinary Clinics Food Animals**, v. 26, p. 105-121, 2010.

RIDPATH, J. F. et al. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 184-191, 2010.

SCHIRRMIEIER, H. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical *Pestivirus* isolate, a putative member of a novel *Pestivirus* species. **Journal General Virology**, v. 85, p. 3647-3652, 2004.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v. 5, p. 223-241, 1996.

STAHL, K. et al. Natural infection of cattle with an atypical “Hobi”- like pestivirus-implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v. 38, p. 517-523, 2007.

STALDER, H. P. et al. Genetic heterogeneity of pestivirus of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 37-41, 2005.

THIEL, H. J. et al. Pestiviruses. In: _____FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (eds.) **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven Co., p. 1059-1074, 1996.

VAN OIRSCHOT J. T. et al. A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Vaccine**, v. 64, p. 169-183, 1999.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 5, p. 51-58, 1974.

VILCEK, S. et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v. 146, n. 1, p. 99-115, 2001.

VOGEL, F. S. F. et al. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 831-838, 2001.

VOGEL, F. S. F. et al. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da Diarréia Viral Bovina. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 83-89, 2002.