

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MONITORAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL BOVINO (BRSV) EM PLANTÉIS LEITEIROS
INFECTADOS PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1).**

Ingrid Bortolin Affonso

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MONITORAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL BOVINO (BRSV) EM PLANTÉIS LEITEIROS
INFECTADOS PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1).**

Ingrid Bortolin Affonso

Orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

A257m Affonso, Ingrid Bortolin
Monitoração da ocorrência do Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) em plantéis leiteiros infectados pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) / Ingrid Bortolin Affonso. -- Jaboticabal, 2010
xii, 47 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Samir Issa Samara

Banca examinadora: Edviges Maristela Pituco, Sandra Possebon Gatti

Bibliografia

1. Bovino - vírus respiratório. 2. Bovino - herpesvírus tipo 1. 3. Prevalência. 4. Monitoração. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.523:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

INGRID BORTOLIN AFFONSO – nascida em 8 de dezembro de 1984, no município de Ribeirão Preto – SP, filha de Carlos Eduardo Affonso e Irene Bortolin Affonso. Ingressou em fevereiro de 2003 no Curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-Unesp - Jaboticabal), concluindo-o em dezembro de 2007. Durante o curso, foi bolsista FAPESP de iniciação científica na área de viroses de bovinos no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, e também participou como voluntária do Programa de Educação Tutorial (PET). Em março de 2008 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV-Unesp - Jaboticabal, concluindo-o em fevereiro de 2010.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”. Augusto Cury

Dedico

À minha amada mãe Irene, por todo carinho, incentivo e pelo grande exemplo de vida.

Ao meu companheiro Estevam, pelo amor mais sincero que existe, e por me mostrar que não existe vergonha quando se busca a felicidade.

Agradeço:

A Deus, por guiar meus passos e estar comigo em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Samir Issa Samara, por todos os ensinamentos e pela confiança em mais um trabalho.

À técnica de laboratório Andréa Souza Ramos de Medeiros, grande amiga, por tudo que me ensinou todos esses anos, por ter tido paciência e principalmente disposição para me ajudar. Muito obrigada!

Às minhas irmãs de laboratório, Bruna Alexandrino, Mônica Costa Oliveira e Lucimara Antônio Borges pela amizade e toda ajuda que sempre me deram.

À pesquisadora Cláudia Pestana Ribeiro, pela amizade, disposição e ensinamentos durante e após o período de treinamento no Instituto Biológico. Agradeço imensamente por tudo!

À Prof^ª. Dr^ª. Sandra Possebon Gatti por ceder as amostras para a produção deste trabalho, por toda atenção oferecida e por ter participado da banca de defesa.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva por toda ajuda, em especial ao Prof. Dr. Luís Antônio Mathias e Prof^ª. Dr^ª. Maria da Glória Buzinaro pela colaboração e sugestões feitas na qualificação dessa dissertação.

À pesquisadora Edviges Maristela Pituco por ter participado da banca e pelas preciosas sugestões feitas neste trabalho.

A todos os funcionários e pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela amizade e convívio.

A toda minha família, em especial às minhas tias-mães Suzette e Manida, por sempre me darem apoio.

À minha “nova família”, em especial aos meus sogros Marize e José Estevam por sempre torcerem por mim.

À FAPESP pelo auxílio financeiro (proc. n^o 08/56693-6) e ao CNPq pela bolsa concedida (proc. n^o 561765/2008-1).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. OBJETIVO	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Obtenção de soro de bovinos para os testes sorológicos	10
4.2 Caracterização da prevalência de BoHV-1	10
4.3 Cálculo amostral para determinar a prevalência de BRSV	11
4.4 Monitoração dos títulos de anticorpos contra BRSV em bezerros	11
4.5 Procedimentos laboratoriais para o BRSV	12
4.5.1 Manutenção das culturas celulares	12
4.5.2 Multiplicação viral	13
4.5.3 Determinação do título infectante viral	13
4.5.4 Teste de virusneutralização	14
4.5.4.1 Pesquisa de anticorpos	14
4.5.4.2 Controle das TCID ₅₀	15
4.6 Análise estatística	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 Ocorrência do BRSV nas três propriedades	17
5.2 Monitoração dos títulos de anticorpos contra BRSV em bezerros	21
5.2.1 Propriedade A	22
5.2.2 Propriedade B	26
5.2.3 Propriedade C	30
5.2.4 Comparação estatística entre as propriedades	33

5.3 Perspectiva da atividade viral	34
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados pela análise na VN de amostras sanguíneas de bezerros provenientes das propriedades dos respectivos municípios (A em Viradouro, B em Altinópolis e C em Jaboticabal) do Estado de São Paulo 23
- Figura 2. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros pertencentes à propriedade A, município de Viradouro, Estado de São Paulo 25
- Figura 3. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros pertencentes à propriedade B, município de Altinópolis, Estado de São Paulo 29
- Figura 4. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV, determinados em amostras sanguíneas de bezerros pertencentes à propriedade C, município de Jaboticabal, Estado de São Paulo 32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Resultados da análise estatística pelo teste exato de Fischer, comparando a frequência de animais positivos no teste de virusneutralização para o BRSV entre as propriedades dos diferentes municípios 19
- Tabela 2. Resultados da análise de amostras de soro sanguíneo dos animais no teste de virusneutralização para BRSV e BoHV-1 e resultados da análise estatística pelo teste exato de Fischer, comparando a frequência de animais positivos para BRSV e BoHV-1 na mesma propriedade 20
- Tabela 3. Títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros nascidos na propriedade A, município de Viradouro, Estado de São Paulo 24
- Tabela 4. Títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV, determinados em amostras sanguíneas de bezerros nascidos na propriedade B, município de Altinópolis, Estado de São Paulo 28
- Tabela 5. Títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV, determinados em amostras sanguíneas de bezerros nascidos na propriedade C, município de Jaboticabal, Estado de São Paulo 31

**MONITORAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO
(BRSV) EM PLANTÉIS LEITEIROS INFECTADOS PELO HERPESVÍRUS BOVINO
TIPO 1 (BoHV-1)**

RESUMO – O Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) é um dos patógenos pertencentes ao complexo respiratório bovino. Apesar de não provocar enfermidade severa na maioria dos casos, há evidências de que este vírus possa facilitar o estabelecimento de outros patógenos. Assim, o presente estudo buscou estabelecer a possibilidade de relação entre o BRSV e o Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1), em três propriedades leiteiras, localizadas em três municípios do noroeste do Estado de São Paulo. Além disso, visou também monitorar ao longo do tempo os títulos de anticorpos contra o BRSV em bezerros desde o nascimento. Com base em dados previamente estabelecidos, essas propriedades foram categorizadas como tendo alta, média e baixa prevalência de BoHV-1, respectivamente, propriedade A, no município de Viradouro, (78,6%); propriedade B, no município de Altinópolis, (40%); e, propriedade C, no município de Jaboticabal, (1,6%). Com relação à prevalência de BRSV, a propriedade B apresentou maior prevalência sorológica (82,4%), possivelmente por possuir fatores de risco facilitadores para o desenvolvimento da infecção, enquanto que as propriedades A e C mostraram prevalências estatisticamente equivalentes (45,6% e 59,1%, respectivamente), sem qualquer correlação entre as prevalências de BRSV e BoHV-1. A curva dos títulos de anticorpos contra o BRSV em bezerros nas propriedades A e B monitorados ao longo de um ano foi semelhante, pois ambas apresentaram redução dos títulos a partir do sexto até o oitavo mês de idade dos animais, com seguida retomada de títulos cada vez mais elevados, fato característico de infecção natural. A propriedade C apresentou uma dinâmica semelhante, porém, a maior parte dos bezerros manteve-se positiva durante todo o período, com títulos que decresceram e voltaram a aumentar.

Palavras-chave: herpesvírus bovino tipo 1, BoHV-1, prevalência, vírus respiratório sincicial bovino, BRSV, fatores de risco, monitoração

EVALUATION AND MEASUREMENT OF THE OCCURRENCE OF THE BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV) IN DAIRY CATTLE INFECTED WITH BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1)

ABSTRACT – The Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) is one of the Bovine Respiratory Complex pathogens. The disease caused by this virus is often mild, but there are evidences that this pathogen may ease the establishment of other pathogens. Data on the epidemiology of BRSV are still scarce. Based on that, this study aimed to determine the prevalence and evaluate antibody titers in calves from three farms. Moreover, the relationship between BRSV and the Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) was investigated, based on epidemiological data previously determined in these farms. The three farms were categorized as A, in Viradouro municipality, with high prevalence of BHV-1 (78.6%); B, in Altinópolis municipality, with intermediate prevalence for this agent (40%); and C, in Jaboticabal municipality, with low prevalence of BHV-1 (1.6%). Farm B showed higher BRSV prevalence (82.4%), maybe due to larger herd and colder climate than farms A and C, which showed equivalent prevalences for BRSV (45.6% and 59.1%, respectively). The curve of antibody titers against BRSV in calves from farms A and B over one year were similar, as both showed lower titers by 6 to 8 months of age, rising up again due to antigenic induction. Farm C showed equivalent dynamics, but calves remained positive all over the year. In disagree to literature data, this experiment did not showed correlation between BRSV and BHV-1 prevalences, maybe due to lack of circulation of the latter.

Palavras-chave: bovine herpesvirus type 1, BoHV-1, prevalence, bovine respiratory syncytial virus, BRSV, risk factors, evaluation

1. INTRODUÇÃO

Devido à intensificação da produção de bovinos na pecuária mundial, a frequência e a intensidade de doenças, principalmente aquelas com sinais clínicos respiratórios, têm aumentado de maneira acentuada, sendo que os problemas de saúde são mais graves quando relacionados à criação de bezerros.

Diversas espécies de bactérias e vírus estão envolvidas no desenvolvimento de enfermidade respiratória. Estudos realizados há décadas relacionaram esses agentes e o manejo de bezerros como causas predisponentes do surgimento de doença. Outras pesquisas demonstraram a ocorrência de doenças que foram ocasionadas por associação entre bactérias e vírus. Esta situação, denominada complexo respiratório bovino, está bem caracterizada por prejudicar o bem-estar dos animais, provocar o uso excessivo de antibióticos e aumentar a mortalidade de bezerros em todo o mundo.

Invariavelmente, o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) é o agente mais frequente e associado a quadros de síndromes respiratórias graves. Nas últimas décadas, a quantidade de trabalhos científicos que relatam a infecção pelo BRSV em vários países aumentou significativamente. Entretanto, no Brasil, as pesquisas nessa área apareceram apenas na metade da década de 90, e mesmo assim, ainda são poucas as informações sobre este vírus em nosso meio.

Outra virose associada a quadros respiratórios, o Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1), já é de conhecimento bem amplo no Brasil. Porém a importância maior relacionada à enfermidade são os problemas reprodutivos que acarreta, principalmente em fêmeas.

Em nosso meio, especula-se muito a respeito da ocorrência de enfermidades respiratórias virais e se uma determinada enfermidade pode ser fator de risco para outra. Particularmente, em relação ao BRSV, existe uma lacuna no que diz respeito a estudos sobre sua epidemiologia e associação entre doenças, sendo uma delas, o BoHV-1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O BRSV é considerado um importante agente patogênico que está associado a episódios de doença respiratória especialmente em animais jovens, fazendo parte do complexo doença respiratória bovina (BAKER et al., 1993; BRYSON et al., 1983; VAN VUUREN, 1994), responsável por desencadear grandes prejuízos econômicos (DUNGWORTH, 1993).

Classificado como membro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus* (MURPHY et al., 1995), o BRSV possui fita única de RNA como material genético e é envelopado (BAKER et al., 1993). Sua dimensão é variável, de 80 a 350 nm de diâmetro, com o capsídeo apresentando forma pleomórfica ou filamentosa (STOTT & TAYLOR, 1985). Além de ser considerado um vírus muito sensível às condições ambientais, também pode ser inativado pelo éter, clorofórmio, e a baixos valores de pH (BAKER & FREY, 1985; STOTT & TAYLOR, 1985).

Este vírus está antigenicamente relacionado ao Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV), bem como aos vírus respiratórios sinciciais ovino (ORSV) e caprino (CRSV). Esses vírus compartilham várias características em comum, como a organização genômica e estrutura viral (TRUDEL et al., 1989).

A partícula viral do BRSV possui um envelope lipídico, derivado da membrana celular do hospedeiro, onde três glicoproteínas organizam-se em forma de espículas na sua superfície (VALARCHER & TAYLOR, 2007), sendo uma delas a proteína G, responsável pela aderência do vírus às células do hospedeiro; a proteína F, responsável pela fusão do vírus com a célula e também com células adjacentes; e, por último, uma pequena proteína hidrofóbica (SH), cuja função ainda não está bem definida (KARGER et al., 2001). Essas estruturas também estão associadas à resposta imunológica do hospedeiro (HUANG & WERTZ, 1982; COLLINS & WERTZ, 1986).

Com a utilização de anticorpos monoclonais em isolados do BRSV, foi possível evidenciar a presença de três diferentes subgrupos antigênicos, denominados A, AB e B, sendo que alguns isolados não se enquadram nessa classificação. As implicações destas diferenças, principalmente no que tange à patogenicidade e imunoprofilaxia

ainda não foram devidamente estudadas (Duncan & Potgieter, 1993 citado por SPILKI & ARNS, 2008). O isolamento desses subgrupos parece estar associado à distribuição geográfica e a questões temporais, sendo que o subgrupo B, isolado no Reino Unido na década de 70, foi reencontrado posteriormente apenas no Brasil (VALARCHER & TAYLOR, 2007; ARNS, 2003; SPILKI et al., 2006)

A patogenia do BRSV ainda não foi bem definida, porém vários estudos têm demonstrado a existência de um mecanismo imunomediado (LARSEN, 2000). O vírus multiplica-se predominantemente em células ciliadas do epitélio respiratório e em pneumócitos tipo II, porém sem causar efeito citopatogênico, fato sugestivo de que a patogenia pode ser derivada dos mecanismos de defesa do hospedeiro (VALARCHER & TAYLOR, 2007). O BRSV induz uma intensa resposta do tipo Th2, com secreção de citocinas que incrementam a síntese de anticorpos e marcada eosinofilia. Este tipo de resposta pode explicar, em parte, a intensa bronquiolite evidenciada nas infecções por este vírus (SPILKI & ARNS, 2008). A replicação viral também tem sido responsabilizada por predispor o hospedeiro a infecções secundárias, em função da alteração dos mecanismos de defesa específicos e não específicos relacionados ao trato respiratório. Por outro lado, o BRSV não determina viremia e raramente é encontrado fora do sistema respiratório (VAN DER POEL et al., 1996; LARSEN, 2000).

A infecção pelo BRSV ocorre tanto em rebanhos de leite quanto de corte, e, em áreas endêmicas, a doença clínica é mais aparente nos animais jovens, sendo caracterizado um rebanho de tamanho maior um fator de risco importante para a disseminação do BRSV (NORSTRÖM et al., 2000; SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; YESILBAG & GÜNGÖR, 2008). O vírus é transmitido para bovinos suscetíveis por meio de secreções respiratórias e aerossóis, tanto por contato direto, quanto por indireto mediado por fômites (HALL & DOUGLAS, 1981; BAKER et al., 1993). O agente viral pode ser isolado a partir de animais assintomáticos (STOTT et al., 1980), também sendo possível que o vírus circule em baixos níveis entre os animais infectados (VAN DER POEL et al., 1996). Geralmente a disseminação do BRSV está ligada a fatores ambientais e de estresse, sendo que os surtos aparecem após queda da temperatura ambiente, comum no inverno (PIRIE et al., 1981; BOHLENDER et al., 1982; MAHIN &

SHIMI, 1982), entretanto alguns surtos também podem ocorrer no verão, devido ao estresse térmico elevado (ODEGAARD & KROGSRUD, 1977; BOHLENDER et al., 1982). Os sinais clínicos podem ser evidenciados após o período de incubação do vírus, com duração de 3 a 5 dias (BAKER et al., 1986a). Esta infecção pode levar a manifestação por alterações respiratórias com intensidade suave até uma severa pneumonia (BAKER et al., 1993). Inicialmente, os animais apresentam descargas nasais e oculares, inapetência, e, em vacas lactantes, diminuição da produção de leite. Ocorre também elevação da temperatura corporal e salivação (BOHLENDER et al., 1982). Na doença mais avançada, os animais apresentam dispneia acentuada, devido ao edema das vias respiratórias superiores e ao enfisema pulmonar, e edemas ao redor dos olhos, que podem se estender para a área submandibular (Frey, 1983 citado por BAKER et al., 1993). Os sinais clínicos podem durar de uma a duas semanas, e, mesmo quando atingem animais prenhes, não são descritos abortos no curso da infecção (BAKER et al., 1985). As reinfecções pelo vírus são comuns, só que com manifestações clínicas brandas ou subclínicas (BAKER & FREY, 1985; STOTT & TAYLOR, 1985; BAKER et al., 1986a). Segundo vários autores, também é possível não haver manifestação clínica da enfermidade na primoinfecção (BOHLENDER et al., 1982; Cancellotti & Carlotto, 1980 citado por BAKER et al., 1986; VERHOEFF & VAN NIEUSTADT, 1984).

Bezerros com menos de um mês de idade geralmente apresentam a forma mais branda da enfermidade. Porém, com o decréscimo dos anticorpos colostrais, entre um e três meses de idade, a infecção é mais severa. Nos bezerros manejados em bezerreiros individuais, o BRSV pode atingir aqueles com mais de duas semanas de vida. KIMMAN et al. (1988) relatam que anticorpos de origem colostrais não são muito eficientes contra uma infecção pelo BRSV nos bezerros, porém o aparecimento e a severidade das manifestações clínicas são inversamente proporcionais ao nível de anticorpos de origem materna que o animal possui. De acordo com BAKER et al. (1986) a média de duração dos anticorpos de origem colostrais nos bezerros é de 99 dias, e a variação de 30 dias, no mínimo, e de 208 dias, no máximo.

Quando ocorre a infecção, o vírus possui predileção por algumas regiões dos pulmões alojando-se inicialmente na porção cranioventral (BRYSON et al., 1979), podendo resultar numa forma severa de pneumonia intersticial atípica (BLOOD, 1962; COLLINS et al., 1988; BAKER & FREY, 1985). Entretanto a maioria das lesões macroscópicas encontradas são áreas consolidadas, com severos enfisemas e edemas distribuídos por todo o pulmão, particularmente os lobos caudais (BAKER & FREY, 1985; COLLINS et al., 1988; KIMMAN et al., 1989; DRIEMEIER et al., 1997; PEIXOTO et al., 2000). Quando há a presença de infecção secundária por bactérias, os pulmões tornam-se mais consistentes, com evidências de bronquiopneumonia fibrinosa e supurativa (BAKER, 1986a; PEIXOTO et al., 2000).

O achado de lesão microscópica característico das infecções virais dos membros da família *Paramyxoviridae* é a formação de numerosos sincícios dentro das estruturas celulares dos alvéolos e no entorno de bronquíolos e brônquios, algumas vezes com a presença de numerosos polimorfos nucleares eosinofílicos (PEIXOTO et al., 2000).

A mortalidade não é um evento comum no rebanho, porém, quando os animais são infectados por uma estirpe altamente virulenta do BRSV, o primeiro sinal observado é a ocorrência de mortes repentinas (BOHLENDER et al., 1982). Não havendo tratamento específico contra essa infecção, dependendo do caso, pode ser utilizada fluidoterapia de suporte, e também administração de anti-inflamatórios e antibióticos, a fim de evitar infecções secundárias (BAKER, 1993; LARSEN, 2000).

Nos rebanhos, para a prevenção ou o controle da enfermidade, podem-se empregar vacinas vivas atenuadas ou inativadas, cujo uso tem vantagens e desvantagens (BAKER et al., 1993). Para VALARCHER & TAYLOR (2007), as vacinas vivas atenuadas são as mais eficientes, porém o uso delas possui resultados controversos. Tanto é que alguns estudos revelam níveis de proteção vacinal diferentes (TAYLOR et al., 1984; FULTON et al., 1995; GERSHWIN et al., 1998), e outros mostraram inclusive que a vacinação pode resultar em doença em alguns animais (GERSHWIN et al., 1998; KIMMAN et al., 1989a). No caso de bezerros muito jovens, que tenham anticorpos de origem colostrar contra o BRSV, a vacina atenuada pode não determinar um efeito esperado, pois a replicação do vírus vacinal seria prejudicada,

limitando a resposta imune. Portanto, uma opção melhor, seria manter os animais jovens sem vacinação e separados de animais mais velhos (KIMMAN & WESTENBRINK, 1990). A presença de variabilidade antigênica do BRSV também deve ser levada em consideração no sucesso da vacinação, pois ainda que exista imunidade sorológica cruzada, não se sabe ao certo os graus de proteção entre os subgrupos (SPILKI & ARNS, 2008).

Diagnosticar o BRSV ainda é um desafio, porque as dificuldades ainda são frequentes nos exames laboratoriais, principalmente para conseguir o isolamento do agente. O teste sorológico para detecção de anticorpos específicos contra o BRSV é a virusneutralização (VN), de preferência com sorologia pareada, realizada em microplacas, e leva em média de 5 a 7 dias (DUBOVI, 1993). O ensaio imunoenzimático (ELISA) também pode ser empregado, porém o seu desenvolvimento deve ser realizado em laboratórios bem equipados (DOMINGUES, 2000), sendo que também há disponível no mercado kits comerciais.

Com relação à distribuição geográfica, o BRSV já foi documentado em diversos países do mundo, tanto por meio de isolamento viral como por investigação sorológica (BAKER & FREY, 1985). Nesse sentido, a literatura também mostra que a enfermidade foi diagnosticada pela primeira vez em 1967, na Suíça, conforme foi descrito por PACCAUD & JACQUIER (1970), e, em seguida, no Japão, por INABA et al. (1970).

Nos Estados Unidos, vários estudos sorológicos comprovam a infecção dos rebanhos, com prevalências que variam de 65% a 81% (BAKER et al., 1985; POTGIETER & ALDRIDGE, 1977). Por isso, acredita-se que dois terços dos rebanhos bovinos desse país possuam animais reagentes ao BRSV (BAKER et al., 1986a).

Nos inquéritos sorológicos realizados em outros países, a prevalência encontrada para o BRSV geralmente é bastante elevada, com taxas acima de 40%, e estes estudos geralmente são acompanhados de investigação para outras enfermidades virais, como BoHV-1, Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 (PI-3), Adenovírus Bovino Tipo 1 e Tipo 3 (BAV-1 e BAV-3), e infecções bacterianas, como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Salmonella Dublin* e o *Mycoplasma*, mostrando que o BRSV

muitas vezes ocorre concomitantemente a esses agentes (HORLEIN, 1973; DURHAM & HASSARD, 1990; OBANDO et al., 1999; SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; YESILBAG & GÜNGÖR, 2008).

No Brasil, ainda são poucas as pesquisas demonstrando a ocorrência da infecção pelo BRSV. O primeiro estudo sobre o vírus foi feito por GONÇALVES et al. (1993) a partir de tecido pulmonar de bezerros colhido em frigoríficos no Estado do Rio Grande do Sul, que foram submetidos à imunofluorescência e também ao isolamento do agente, em cultivo celular.

O primeiro isolamento do BRSV em rebanhos foi feito a partir de secreção nasotraqueal de bezerros com sinais respiratórios provenientes do Rio Grande do Sul, conforme descrito por ARNS et al. (2003), que caracterizaram a estirpe como BRSV-25-BR. Posteriormente, ALMEIDA et al. (2006) também isolaram o vírus a partir de um animal com severa doença respiratória.

Alguns inquéritos sorológicos evidenciaram que o vírus está disseminado pelos rebanhos brasileiros. Estima-se que 95% dos animais até os 3 anos de idade possuam anticorpos contra o BRSV e que 70% desses animais foram infectados no primeiro ano de vida (Furze et al., 1997 citado por ARNS et al., 2003).

CAMPALANS & ARNS (1997) encontraram soroprevalência de 68% aplicando o teste de VN em 864 amostras de soro provenientes de 65 fazendas localizadas no sul do Brasil. DRIEMEIER et al. (1997) descreveram o BRSV como doença natural em bovinos de corte de criação extensiva no Rio Grande do Sul, utilizando vários procedimentos laboratoriais para o diagnóstico, entre os quais a VN. No Estado de São Paulo, ARNS (1996) mostrou a ocorrência do BRSV em rebanhos de leite e de corte, com ou sem sinais clínicos da enfermidade, que alcançaram 87%.

No Estado de Alagoas, a ocorrência da infecção pelo vírus foi comprovada em animais importados da Europa, relato que descreve pelo menos 220 mortos em decorrência da doença (PEIXOTO et al., 2000).

A associação do BRSV com outras enfermidades bacterianas e virais já foi descrita em outros países, com a alegação de que este vírus seja um facilitador para infecções secundárias (BAKER et al., 1986a). Pela difusão epidemiológica, a atuação

concomitante do BRSV e do BoHV-1 num mesmo local deve ser considerada, pois os dois vírus estão relacionados à síndromes respiratórias.

A epidemiologia do BoHV-1, vírus que também está relacionado a desordens reprodutivas e potencializando perdas econômicas (VAN DONKERSGOED & BABIUK, 1991; HAGE et al. 1996), está presente em plantéis bovinos de praticamente todo o mundo (DEL FAVA et al., 2002).

Este vírus, após a infecção, permanece latente nos gânglios nervosos do hospedeiro, o que torna o animal portador por toda a sua vida. A reativação do vírus ocorre após períodos de imunossupressão, como, por exemplo, estresse, transporte e parição, ocasião que o portador pode excretar e transmitir o vírus para outros animais do rebanho, fato que complica a erradicação da enfermidade (ACKERMANN et al., 1982).

A sorologia pareada, realizada pelas técnicas de VN e ELISA, é a forma de diagnóstico auxiliar para as infecções pelo BoHV-1 mais acessível, inclusive sendo recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2009). Estudos realizados no Brasil com essas técnicas têm demonstrado uma distribuição variável do vírus nos rebanhos brasileiros. Neste caso estão especificados na literatura os seguintes resultados de análise: 10,56% de 246 animais, no Estado do Paraná (KRUGER et al., 1991); 58,2% de 5.511 animais, no Estado de Minas Gerais (ROCHA et al., 2001); 70% de 400 animais, nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro (ANUNCIAÇÃO et al., 1989); 86,8% de 121 animais, no Estado de São Paulo (MOREIRA et al., 2001); 86,2% de 1.715 animais, no Estado de Rondônia (OKUDA et al., 2006). Para recomendar procedimentos de controle da enfermidade em nosso país, DEL FAVA (1996) classificou que nas propriedades com até 20% de animais positivos para o BoHV-1 a prevalência seria considerada baixa; de 20% a 50%, de prevalência média; e acima de 50% de animais positivos, de alta prevalência para o BoHV-1.

Apesar dessas duas viroses relatadas serem agentes do complexo respiratório bovino, não há disponível na literatura brasileira estudos relacionando as duas enfermidades, sendo também raras as informações a respeito da epidemiologia do BRSV em bezerros até 12 meses de idade.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Analisar comparativamente as prevalências de BRSV e de BoHV-1 em três propriedades de aptidão leiteira.

3.2 Objetivos Específicos

- determinar a prevalência de BRSV em três propriedades com alta, média e baixa prevalência de BoHV-1;
- verificar se existe associação entre o BRSV e BoHV-1;
- analisar a possível existência de fatores de risco para o desenvolvimento do BRSV; e
- monitorar os títulos de anticorpos contra o BRSV em bezerros, desde o nascimento até um ano de idade, nas três propriedades.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de soro de bovinos para os testes sorológicos

Para as análises sorológicas, foram utilizadas amostras de soro que fazem parte da soroteca do Laboratório de Víruses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, as quais encontravam-se armazenadas em freezer a -20°C. Essas amostras foram colhidas de um estudo anterior, conduzido por MOREIRA (2004).

De acordo com os registros, as amostras foram obtidas em três propriedades rurais de exploração leiteira, que possuíam bovinos com predominância da raça holandesa criados em regime de confinamento, localizadas em três municípios no noroeste do Estado de São Paulo, que foram Viradouro (propriedade A, rebanho de 140 animais), Altinópolis (propriedade B, rebanho de 380 animais) e Jaboticabal (propriedade C, rebanho de 80 animais). Viradouro está localizada em uma altitude média de 500 metros acima do nível do mar, com clima tropical, classificada como Aw na classificação de Koeppen. Altinópolis, situada em uma região a 900 metros de altitude acima do nível do mar, possui clima tropical de altitude, sendo classificada como Cwa também na classificação de Koeppen. Jaboticabal possui a mesma classificação de Viradouro (Aw) (CEPAGRI, 2009).

Todas as propriedades possuíam condições semelhantes no que se refere ao manejo nutricional, trânsito de animais, ausência de vacinação contra BRSV e BoHV-1 e ocorrência de enfermidades.

4.2 Caracterização da prevalência de BoHV-1

De acordo com um levantamento preliminar realizado por MOREIRA (2004), estas propriedades (item 4.1) foram classificadas como de baixa, média e alta prevalência de BoHV-1, de acordo com a proposta de DEL FAVA (1996). Para isso, amostras de soro foram analisadas pelo teste de VN para BoHV-1 seguindo o protocolo

preconizado pela OIE (2004). De acordo com o teste, a propriedade A, localizada em Viradouro, foi classificada como de alta prevalência (78,6%), a propriedade B em Altinópolis, como de média prevalência (40%), e a propriedade C, em Jaboticabal, como de baixa prevalência (1,6%) de BoHV-1.

4.3 Cálculo amostral para determinar a prevalência do BRSV

Para o cálculo da amostragem de cada propriedade para determinação da prevalência do BRSV, foi utilizada a fórmula $n = Z^2 \cdot pq / (p \cdot d / 100)^2$ de acordo com AUSTUDILLO (1979). Nesta fórmula, **n** representa o número de amostras, **Z** é igual a $1 - \alpha$ (um menos alfa) e refere-se ao grau de confiança, **p** é a estimativa de animais positivos para BRSV (80%), baseada em trabalhos realizados anteriormente no Brasil por ARNS (1996), **q** é igual a $1 - p$ e **d** é o erro admitido (10%). O valor de **Z** foi obtido a partir de tabelas sobre a curva de distribuição normal. Utilizou-se um nível de confiança de $\alpha = 0,05$ (95%). Assim, após a aplicação da fórmula, o **n** encontrado foi corrigido de acordo com o número de animais de cada propriedade, utilizando a fórmula $n_c = n / 1 + (n - 1 / N)$, em que **N** representa o total de animais.

Com base nesses cálculos, ficou determinado que para a propriedade A o número de amostras analisadas seria 57, para a propriedade B, 77 amostras, e para a propriedade C, 44 amostras.

Como estas mesmas propriedades passaram por um estudo anterior com análise de soro sanguíneo (MOREIRA, 2004), as mesmas amostras que estavam identificadas e armazenadas em freezer a -20°C foram utilizadas para o presente estudo, tomando os devidos cuidados de aleatoriedade.

4.4 Monitoração dos títulos de anticorpos contra BRSV em bezerros

Para a monitoração dos títulos de anticorpos em bezerros, foi feita a escolha aleatória de dez bezerros de cada propriedade, cujos soros colhidos nos dias 1, 2, 15 e mensalmente até os 12 meses de idade de cada animal por MOREIRA (2004) foram

analisados na VN para o BRSV. De acordo com os registros, imediatamente após o nascimento, todos os bezerros permaneceram com suas mães para a ingestão de colostro, e, caso isso não ocorresse de forma espontânea, o colostro era retirado e administrado por mamadeiras. Em seguida, os bezerros foram separados em bezerreiros individuais, nos quais permaneceram por 60 dias, até o desmame, para serem então colocados em piquetes, agrupados em lotes, de acordo com a faixa etária.

4.5 Procedimentos laboratoriais para o BRSV

4.5.1 Manutenção das culturas celulares

Para a realização do teste de VN e multiplicação da estirpe viral do BRSV foram utilizadas células de linhagem permanente Madin & Darby Bovine Kidney (MDBK), mantidas em monocamada em garrafas de poliestireno TPP[®], contendo meio de manutenção “Minimum Essential Medium” (Eagle-MEM) Gibco[®], filtrado em filtro Millipore de 0,22µm, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio, mantido em pH 7, e, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) Cultilab[®]. Para a replicação celular, realizada a cada 48 horas, o meio de manutenção foi desprezado e o tapete celular lavado duas vezes com tripsina-versene Difco[®] a 0,2% aquecida, para retirar o meio de manutenção restante, e numa terceira vez, a tripsina foi mantida por 5 minutos. Desprezada a tripsina, as garrafas foram batidas para ocorrer o desprendimento do tapete celular e a individualização das células. As células então foram ressuspensas em meio de manutenção, e uma alíquota retirada para contagem celular em câmaras de Neubauer utilizando Azul de Tripán. Realizados os cálculos, para as reações de VN preparava-se uma suspensão com $3,0 \times 10^5$ céls./mL e para outros subcultivos, $2,0 \times 10^5$ céls./mL, os quais receberam meio de manutenção. A seguir, as garrafas foram colocadas em estufa à temperatura de 37°C para formação de novo tapete celular.

4.5.2 Multiplicação viral

A amostra do vírus BRSV utilizada neste experimento foi proveniente do Laboratório de Viroses dos Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo, SP. Toda metodologia empregada para o BRSV foi a mesma que era empregada pelo Instituto Biológico de São Paulo (RIBEIRO, C. P. - comunicação pessoal). A estirpe doada havia sido passada anteriormente em células CRIB (linhagem de células de rim de bovino resistente ao BVDV), e já estava adaptada para o uso em células MDBK. Para o uso na VN, a estirpe viral foi multiplicada sucessivamente em células MDBK para a formação de estoque viral. A amplificação viral foi realizada em monocamadas de células MDBK, na concentração de $2,0 \times 10^5$ céls./mL, cultivadas em frascos de poliestireno de 25 cm², no período de 24 horas, conforme descrito no item 4.5.1. Com o tapete celular formado, o meio de manutenção foi desprezado, e 1mL do vírus foi inoculado dentro da garrafa. A cultura foi incubada à temperatura de 37°C, durante 60 minutos, para que ocorresse a adsorção do vírus às células. Após esse período, adicionaram-se 8mL de meio de manutenção à garrafa, e desta forma foi mantida em incubação à temperatura de 37°C durante um período variável, de 5 a 7 dias, tempo que dependeu da intensidade do efeito citopatogênico (ECP), visualizado em microscópio invertido. Quando o ECP atingiu aproximadamente 70%, a garrafa foi congelada à temperatura de -20°C e descongelada rapidamente à temperatura de 37°C para assim ocasionar o rompimento das células e a liberação das partículas virais. Após, o material foi submetido à centrifugação à temperatura de 4°C a 1.800 G durante 15 minutos para a decantação dos restos celulares. Em seguida, o sobrenadante viral foi separado e distribuído em alíquotas de 1mL em criotubos para armazenamento à temperatura de -196°C, em nitrogênio líquido.

4.5.3 Determinação do título infectante viral

A titulação viral foi realizada em placas de poliestireno descartáveis, com 96 cavidades de fundo chato TPP[®]. Inicialmente, 500µL de vírus foram diluídos em 4,5 mL

de Eagle-MEM, em tubos de ensaio mergulhados em banho de gelo para a diluição seriada do vírus na base 10 (10^{-1} a 10^{-8}). Após a diluição, em 64 cavidades (colunas 1 a 8) foram distribuídos 50 μ L de meio Eagle-MEM sem soro. A seguir, foi adicionado, a cada cavidade da coluna, um volume de 50 μ L de diluição do vírus, começando a distribuição da última (10^{-8}) para a primeira diluição (10^{-1}). Por último, foi adicionada uma suspensão de células MDBK em uma concentração de $3,0 \times 10^5$ céls./mL, inclusive nas duas últimas colunas da placa, contendo apenas 100 μ L de meio, em cada cavidade, para controle da qualidade celular. A placa foi então mantida sob a temperatura de 37°C, em incubadora com atmosfera controlada de 5% de CO₂, por 96 horas. A leitura foi feita pela verificação do ECP por observação em microscópio invertido. O cálculo do título infeccioso do vírus, capaz de determinar 50% de destruição na cultura de células (TICC50%), foi realizado pelo método de REED & MUENCH (1938).

4.5.4 Teste de virusneutralização

4.5.4.1 Pesquisa de anticorpos

Os soros que foram testados foram descongelados, inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos, e colocados em duplicata nas microplacas de 96 cavidades. Na primeira coluna de cada placa, foram adicionados 100 μ L de meio Eagle-MEM em cada cavidade, e nas demais colunas, 50 μ L, excetuando a coluna 3. Os soros em teste (50 μ L) foram adicionados nas cavidades das colunas 2 e 3. A partir da coluna 3 (diluição 1:2), foi feita a diluição seriada do soro até a coluna 12 (diluição 1:1024), e após, 50 μ L de suspensão viral ajustada a uma concentração de 200 TCID₅₀ foram adicionados nessas cavidades. As microplacas foram incubadas por 60 minutos em estufa com tensão controlada de 5% de CO₂ à temperatura de 37°C. Após esse período, foram acrescentados 50 μ L de uma suspensão de células MDBK, em uma concentração de $3,0 \times 10^5$ céls./mL, em todas as cavidades da microplaca. Esta foi novamente incubada nas mesmas condições por um período de 96 horas. Realizada a

leitura, a amostra de soro considerada reagente pela presença de anticorpos foi aquela que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2. Amostras pareadas de cada animal foram testadas na mesma microplaca, e o título, expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar as 200 TCID₅₀, foi calculado por meio de média geométrica. Após efetuadas as médias, os valores dos títulos foram transformados em logaritmo (log) de base 10, para melhor visualização dos resultados. Os valores menores que 0,30 foram considerados negativos, por ser esta a primeira diluição positiva.

4.5.4.2 Controle das TCID₅₀

Para todos os testes de VN realizados, foi feita uma placa de retrotitulação e controle de TCID₅₀ para verificação e validação das provas. Como para o BRSV o intervalo de variação aceito é de 20 a 200 TCID₅₀, utilizou-se a mesma diluição que definiu as 200 TCID₅₀ (item 4.5.4.1) na placa de validação da reação, e a partir desta foram obtidas as diluições que definiram 0,2 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀ e 20 TCID₅₀. Com as diluições prontas, preencheram-se as 96 cavidades da placa; nas quatro primeiras colunas, foram colocadas as diluições contendo 0,2 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀, 20 TCID₅₀ e 200 TCID₅₀ respectivamente. Da sexta à nona coluna, foi feito controle do título viral, da mesma forma descrita no item 4.5.3. Sendo assim, a partir do conhecimento do título utilizado no teste, preencheu-se a placa com as diluições próximas àquelas do título viral. A quinta e a décima colunas ficaram vazias, pois não foi adicionado nenhum reagente nas cavidades. A última coluna desta placa foi destinada ao controle da suspensão celular.

Foram adicionados 50µL de meio de manutenção Eagle-MEM e 50µL de cada diluição por cavidade nas colunas correspondentes às diluições definidas. Após incubação em estufa à temperatura de 37°C em tensão controlada de 5% de CO₂ por 60 minutos, foram adicionados, em todas as cavidades em uso da placa, 50µL da suspensão viral de células contendo 3,0x10⁵ céls./mL em meio de manutenção Eagle-MEM acrescido de 10% de SFB.

Posteriormente, essa placa foi incubada junto com as demais (descritas no item 4.5.4.1), por 96 horas e sua leitura foi feita anteriormente, pois os resultados nela encontrados poderiam validar ou não o teste realizado.

4.6 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o teste exato de Fischer para comparar animais positivos e negativos para o BRSV, entre as propriedades, e animais positivos e negativos para o BRSV e BoHV-1 na mesma propriedade.

Em relação ao monitoramento dos anticorpos em bezerros, primeiramente foi feita a comparação dos diferentes períodos de colheita, realizados nos dias 1, 2 e 15 e mensalmente, do primeiro mês até os 12 meses, em cada propriedade, pelo ANOVA simples e teste de Tukey. Depois, as três propriedades foram comparadas entre si, em cada colheita, utilizando o mesmo teste estatístico. Todas as análises foram feitas pelo programa GraphPad Prism[®] versão 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ocorrência do BRSV nas três propriedades

Na maioria dos casos, as viroses respiratórias estão enquadradas, antes de qualquer outro fator, como causas preliminares de distúrbios respiratórios nos bovinos de produção na atividade agropecuária. Porém, a combinação das viroses com alguns desses fatores, tais como estresse, bactérias presentes no ambiente e micoplasma, facilitam o desenvolvimento da complexa síndrome respiratória bovina (HOERLEIN, 1973).

Entre as viroses mais importantes que participam da etiologia da síndrome respiratória dos bovinos estão o BRSV, PI-3, BoHV-1, o BAV-1, BAV-3 e o BVDV. Diversos autores admitem que o BRSV possui um papel crucial no desenvolvimento de doença respiratória em diferentes tipos de exploração, porém, em fazendas de aptidão leiteira, esse problema é mais acentuado (KIMMAN et al., 1988; LARSEN, 2000).

Em nosso país, ainda são poucas as pesquisas sobre o BRSV, inclusive as que visam mostrar aspectos epidemiológicos da enfermidade nos rebanhos. Por isso, este trabalho teve como um de seus objetivos pesquisar a prevalência de BRSV em três propriedades de aptidão leiteira, caracterizadas por MOREIRA (2004) como de alta, média e baixa prevalência de BoHV-1.

Anticorpos contra o BRSV foram encontrados nos animais adultos das três propriedades em estudo por meio do teste de VN, indicando, portanto, que os animais já haviam entrado em contato com o agente nas regiões estudadas. Na propriedade A, cuja prevalência foi classificada como alta para o BoHV-1 (78,6%), foram analisadas 57 amostras, das quais 26 (45,6%) foram positivas para o BRSV. Na propriedade B, classificada como de média prevalência de BoHV-1 (40%), das 77 amostras analisadas, 65 (84,4%) foram positivas para o BRSV. Já para a propriedade C, de baixa prevalência de BoHV-1 (1,6%), nas 44 amostras analisadas, foram positivas 26 (59,1%) para o BRSV. Em relação à titulação de anticorpos para o BRSV destas amostras, houve uma discreta variação no material das três propriedades. Na propriedade A, os títulos

variaram de 0,30 a 1,35, com média de 0,30; na propriedade B, variaram entre 0,30 e 1,51, com média de 0,53; e de mesmo modo, na propriedade C, a variação encontrada foi de 0,30 a 1,35, com média de 0,40 dos títulos de anticorpos para o BRSV.

A partir destes resultados observou-se que a prevalência do BRSV encontrada nessas propriedades está de acordo com outros estudos sorológicos, realizados por meio da VN ou ELISA, em bovinos de diversos países, os quais constataram prevalências sempre maiores que 40% (DURHAM & HASSARD, 1990; ARNS, 1996; CAMPALANS & ARNS, 1997; OBANDO et al., 1999; SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; YESILBAG & GÜNGÖR, 2008). No Estado de São Paulo, ARNS (1996) pesquisou a ocorrência do BRSV em rebanhos de leite e de corte, com ou sem sinais clínicos da enfermidade, encontrando prevalências que alcançaram 87%. Apesar dos achados de literatura, a comparação das prevalências obtidas neste estudo com relatos anteriores deve ser feita com cautela, pois os rebanhos são de regiões diferentes e pouco se sabe sobre a ocorrência de doenças concomitantes ao BRSV no Brasil. Mesmo assim, no contexto geral, as prevalências observadas nas fazendas do presente estudo sugerem que o BRSV, pelo menos nesta região do Brasil, possui prevalência semelhante à observada em outros países.

Quanto à análise estatística, o teste exato de Fischer foi aplicado para comparar as três propriedades quanto à prevalência de BRSV, e também para comparar as prevalências entre o BRSV e o BoHV-1 dentro de cada propriedade. No primeiro caso, comparando o número de animais positivos e negativos para o BRSV, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) da propriedade A (BoHV-1/alta) com B (BoHV-1/média) e B (BoHV-1/média) com C (BoHV-1/baixa), e não houve diferença estatística significativa entre as propriedades A (BoHV-1/alta) e C (BoHV-1/baixa). Estes dados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados da análise estatística pelo teste exato de Fischer, comparando a frequência de animais positivos no teste de virusneutralização para o BRSV entre as propriedades dos diferentes municípios.

Propriedade	Município	Nº total de animais rebanho	Nº de amostras analisadas BRSV*	Amostras positivas (%)	Amostras negativas (%)
A	Viradouro	140	57	26 (45,6%) ^a	31 (54,4%)
B	Altinópolis	380	77	65 (84,4%) ^b	12 (15,6%)
C	Jaboticabal	80	44	26 (59,1%) ^a	18 (40,9%)

* N calculado segundo AUSTUDILLO (1979)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Como as três propriedades possuíam semelhanças em relação ao manejo nutricional, sanitário e no manejo geral do rebanho, como o número de ordenhas e a não introdução no período de estudo de animais novos no rebanho, supõe-se que existia a influência de fatores de risco que poderia estar associado à maior prevalência de BRSV em uma propriedade do que em outra. De acordo com NORSTRÖM et al. (2000), SOLÍS-CALDERÓN et al. (2007) e YESILBAG & GÜNGÖR (2008) um fator de risco associado à prevalência do BRSV é o tamanho do rebanho. Segundo esses autores, em rebanhos com grande número de animais, o vírus se dissemina mais facilmente, porque há possibilidade de maior contato entre eles, sendo também maior o número de pessoas, fazendo com que elas atuem como meio indireto de transmissão do vírus, por carrear o agente em roupas, botas e equipamentos necessários para o manejo dos animais, favorecendo a disseminação viral. Esse fator pode ter sido a causa da maior prevalência de BRSV na propriedade B (84,4%), pois possuía o maior rebanho. No entanto, apesar da propriedade C possuir o menor rebanho, obteve maior prevalência de BRSV (59,1%) do que a propriedade A (45,6%), possivelmente pela característica dessa propriedade fazer parte de uma instituição de ensino, e assim havia contato intenso entre pessoas e animais.

Outra possibilidade de fator de risco que pode ter influenciado a diferença de prevalência da enfermidade nas propriedades foi a condição climática. A propriedade B (Altinópolis) está localizada em um município que possui uma maior altitude em relação

ao nível do mar, e também uma classificação climática caracterizada por temperaturas mais amenas, diferente da A (Viradouro) e C (Jaboticabal). Como a propriedade B diferiu significativamente das demais e obteve a maior prevalência de BRSV, pode ser que o vírus se estabeleceu com maior facilidade devido às condições climáticas favorecidas pela temperatura ambiente mais amena. Surtos de doença respiratória, tendo como causa o BRSV, ocorrem tanto no verão quanto no inverno, porém existem mais relatados em ambientes frios (PIRIE et al., 1981; BOHLENDER et al., 1982; MAHIN & SHIMI, 1982; BAKER et al., 1993).

Segundo a mesma análise estatística, quando foram comparadas as prevalências do BRSV e de BoHV-1 numa mesma propriedade, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as duas viroses. As prevalências do BRSV nas propriedades B (BoHV-1/média) e C (BoHV-1/baixa) foram maiores que a prevalência de BoHV-1 e na propriedade A (BoHV-1/alta), a prevalência do BRSV foi estatisticamente menor que a prevalência de BoHV-1). Os dados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados da análise de amostras de soro sanguíneo dos animais no teste de virusneutralização para BRSV e BoHV-1 e resultados da análise estatística pelo teste exato de Fischer, comparando a frequência de animais positivos para BRSV e BoHV-1 na mesma propriedade.

Propriedade	Município	Nº total de animais rebanho	BRSV		BoHV-1	
			Nº de amostras analisadas	Amostras positivas (%)	Nº de amostras analisadas*	Amostras positivas (%)
A	Viradouro	140	57	26 (45,6%) ^a	84	66 (78,6%) ^b
B	Altinópolis	380	77	65 (84,4%) ^c	156	63 (40%) ^d
C	Jaboticabal	80	44	26 (59,1%) ^e	64	1 (1,6%) ^f

* MOREIRA (2004)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Apesar das propriedades estudadas terem empregado os mesmos procedimentos de manejo e protocolos sanitários, a prevalência de BRSV na propriedade B (BoHV-1/média) foi maior que nas demais propriedades. Se houvesse qualquer interação entre o BRSV e o BoHV-1, seriam esperadas diferenças estatísticas entre as propriedades A (BoHV-1/alta) e C (BoHV-1/baixa), pois as prevalências de BoHV-1 nesses rebanhos foram fortemente discrepantes. Portanto, pelo menos nas propriedades estudadas, não houve interação entre o BRSV e o BoHV-1, porque a diferença nas prevalências observadas em cada rebanho não possibilitou determinar qualquer importância epidemiológica relacionada às viroses pesquisadas.

5.2 Monitoração dos títulos de anticorpos contra BRSV em bezerros

A presença de anticorpos contra determinadas doenças em bezerros jovens está relacionada, em um primeiro momento, à transferência passiva de anticorpos maternos induzidos nas fêmeas por antígenos relacionados ao agente. No caso do BRSV, BAKER et al. (1986), determinaram como sendo de 99 dias o período médio da permanência de anticorpos de origem colostrar em bezerros. No entanto, estes anticorpos não são suficientes para proteger os animais frente a uma infecção natural pelo vírus, pois a ocorrência de sinais clínicos respiratórios está diretamente relacionada com a quantidade de anticorpos de origem colostrar presente no bezerro (KIMMAN et al., 1988). Por isso, o trabalho em apreço também teve como objetivo monitorar por 12 meses as variações dos títulos de anticorpos contra o BRSV em bezerros jovens provenientes das três propriedades leiteiras em estudo, desde o primeiro dia de vida de cada animal, para verificar a persistência de anticorpos colostrais e/ou concomitante indução antigênica por infecção natural.

Os resultados encontrados, separados por propriedades, demonstraram que num primeiro momento, os anticorpos presentes nos soros desses animais eram de origem colostrar, e que, no decorrer da pesquisa, foram decrescendo até o completo desaparecimento em alguns animais em determinados períodos. Logo depois, os anticorpos foram detectados novamente, inclusive sendo observado aumento na média

dos títulos dos bezerros até o final do estudo, nas três propriedades, quando eles atingiram 12 meses de idade. Os dados das três propriedades estão apresentados graficamente na figura 1.

5.2.1 Propriedade A

A tabela 3 mostra os títulos de anticorpos neutralizantes para o BRSV nos soros sanguíneos de bezerros, determinados por meio do teste de VN. Pela análise das médias, esses títulos foram crescentes da primeira colheita (0,94), com um dia de idade, para a terceira colheita (1,00), com 15 dias de idade. A partir do primeiro mês (0,92) ocorreu a queda dos títulos de anticorpos para o segundo (0,71) e continuou a diminuir no terceiro (0,61), quarto (0,52), quinto (0,37), sexto e sétimo mês (0,30), até que a média do oitavo mês tornou-se negativa, ou seja, menor que 0,30. No nono mês os animais voltaram a apresentar o título mínimo (0,30), que foi aumentando no décimo (0,50), décimo primeiro (0,70) até o décimo segundo mês (0,74), com ligeira elevação mensal. A representação gráfica destes resultados está apresentada na figura 2.

A análise dos dados de cada animal revelou que o menor tempo de duração dos anticorpos de origem colostrar foi de 4 meses (bezerros 6 e 7), e o maior de 8 meses (bezerro 2), com média de 5,6 meses entre os animais que se tornaram negativos no monitoramento. Alguns bezerros (números 1, 3, 4, 5 e 8) em nenhum momento foram negativos no teste ao longo do tempo, o que dificultou deduzir quando os anticorpos colostrais desapareceram. Porém os títulos desses animais caíram para níveis baixos em um determinado momento e depois se elevaram até o final da pesquisa.

Apesar da prevalência de BRSV encontrada nos animais adultos desta propriedade ser menor que as demais (45,6%), os bezerros apresentaram maiores títulos de anticorpos, que, no cálculo da média, desapareceram também no oitavo mês. A partir do nono mês, os anticorpos voltaram a aparecer em níveis crescentes e permaneceram assim até o final do estudo. Nesta propriedade, no contexto geral, foi detectada a maior persistência de anticorpos colostrais (8 meses), sendo esses achados parecidos aos encontrados por BAKER et al. (1986), cujo menor e maior

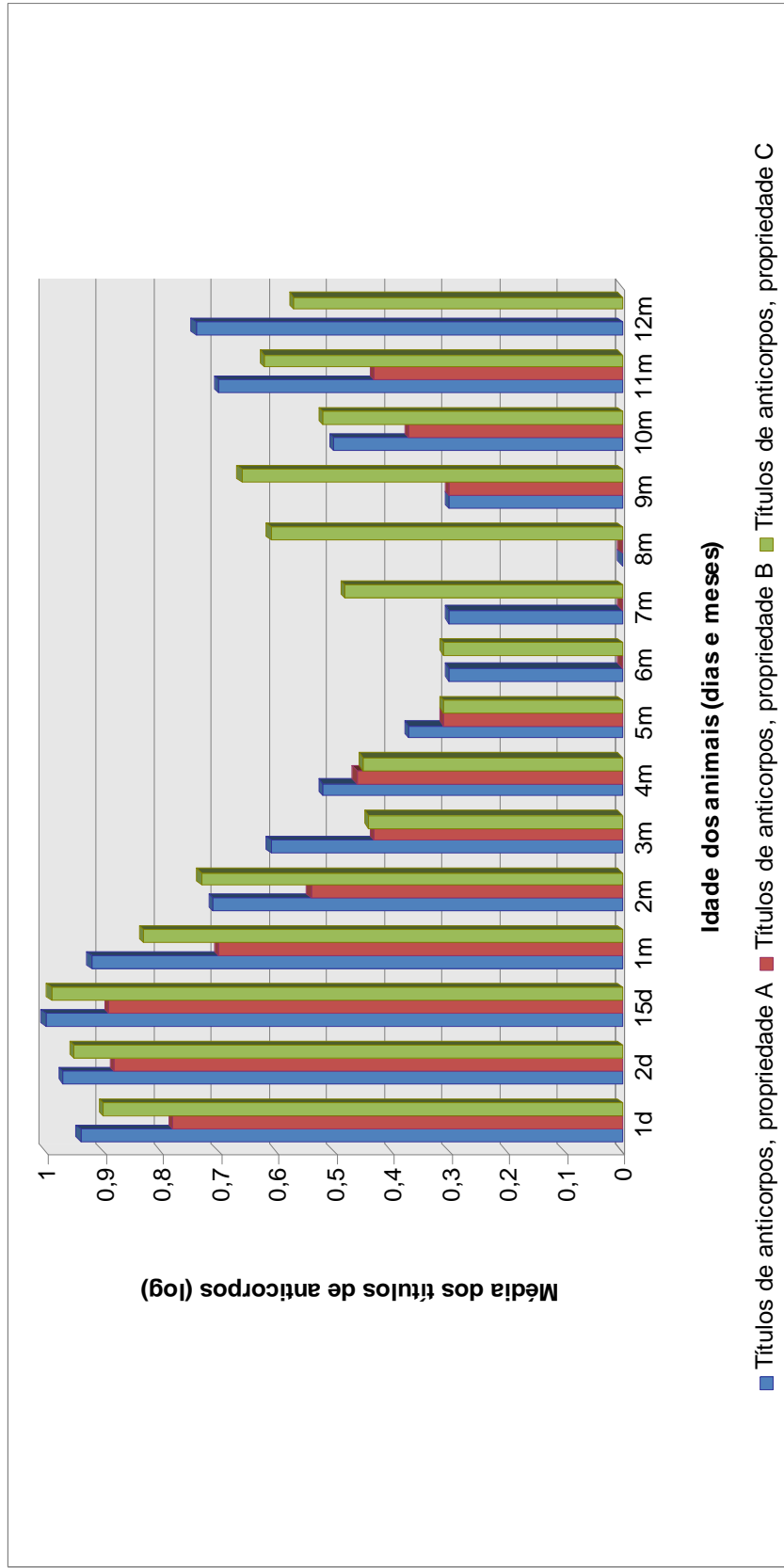


Figura 1. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados pela análise na VN de amostras sanguíneas de bezerros provenientes das propriedades dos respectivos municípios (A em Viradouro, B em Altinópolis e C em Jaboticabal) do Estado de São Paulo.

Tabela 3. Títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros nascidos na propriedade A, município de Viradouro, Estado de São Paulo.

Número de identificação dos bezerros	Idade dos bezerros														
	1d	2d	15d	1m	2m	3m	4m	5m	6m	7m	8m	9m	10m	11m	12m
1	0,60	1,04	1,04	1,35	1,20	1,04	0,60	0,74	0,43	0,43	0,30	0,30	0,60	0,43	0,30
2	1,35	1,20	1,20	1,04	0,43	0,43	0,60	0,30	0,30	0,30	0,30	N	0,30	0,30	0,60
3	1,20	1,17	0,90	1,04	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,54	0,30	0,30	0,43	0,60	0,60
4	0,90	0,90	1,20	1,04	0,74	0,60	0,60	0,30	0,30	0,30	0,30	0,60	0,43	0,43	0,60
5	1,20	1,04	1,04	0,74	0,60	0,60	0,43	0,43	0,30	0,30	0,30	0,30	0,74	0,60	0,90
6	0,60	0,60	0,74	0,43	0,60	0,60	0,30	N	N	N	N	N	N	1,04	1,47
7	0,43	0,74	0,74	0,74	0,90	0,43	0,30	N	N	N	N	0,60	0,30	0,60	0,43
8	0,85	0,60	1,04	1,04	0,90	0,60	0,43	0,43	0,30	0,43	0,43	0,60	0,74	0,74	0,60
9	1,04	1,04	0,74	0,74	0,43	0,60	0,60	0,43	N	N	N	0,30	0,30	1,20	0,90
10	1,20	1,35	1,35	1,04	0,74	0,60	0,74	0,43	0,43	0,43	N	N	1,20	1,04	1,04
Média	0,94	0,97	1	0,92	0,71	0,61	0,52	0,37	0,30	0,30	0,19*	0,30	0,50	0,70	0,74

(N)

*Títulos menores que 0,30 são considerados negativos na prova de VN.

d – dias

m – meses

N – negativo

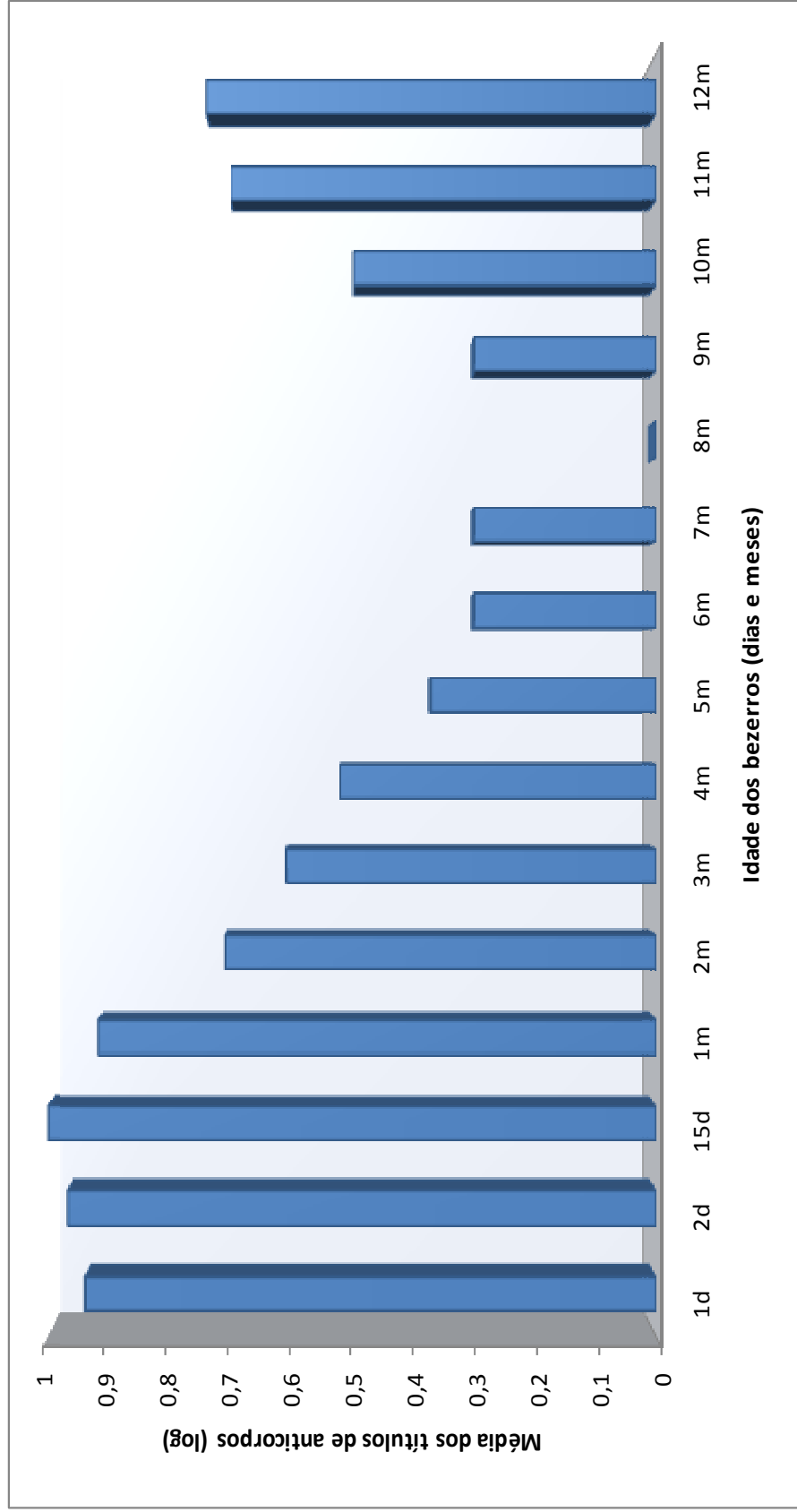


Figura 2. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros pertencentes à propriedade A, município de Viradouro, Estado de São Paulo.

período de tempo para o desaparecimento de anticorpos colostrais foi 1 e 7 meses respectivamente. No entanto, na propriedade A, apesar da presença de anticorpos colostrais, alguns bezerros, independentemente da idade, foram acometidos por doença respiratória. Quando os sinais clínicos apareciam, os animais eram tratados com dose única de Pentabiótico (Fort Dodge[®]). Provavelmente esses bezerros se infectaram por algum agente, inclusive viral, e quando submetidos ao tratamento, não desenvolveram infecção secundária por bactérias e com isso, minimizou-se o agravamento da doença. Como foi evidenciado o BRSV no plantel por meio dos exames sorológicos, este pode ter sido uma das causas dessas infecções.

Com relação à análise estatística, os resultados laboratoriais da colheita de material feita nos períodos estipulados, nos dias 1, 2, 15 e mensalmente, do primeiro mês até os 12 meses, foram analisados pelo ANOVA simples, e quando determinada diferença estatística, foi aplicado o teste de Tukey com o intuito de revelar em quais períodos de colheita houve diferença significativa. Sendo assim, o teste revelou diferença ($p < 0,05$) entre os títulos de anticorpos das quatro primeiras colheitas (dias 1, 2, 15 e mês 1) e as colheitas feitas nos meses 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Porém, não houve diferença significativa entre as citadas colheitas anteriores e os meses 2 e 3, por serem os meses em que os anticorpos colostrais estavam diminuindo. Com relação ao mês 8, colheita em que a média indicou o desaparecimento dos anticorpos de origem colostrais, houve diferença estatística deste mês com as colheitas feitas nos dias 1, 2 e 15 e dos meses 1, 2, 3, 9, 10, 11, 12, no entanto, não houve diferença deste mês com as colheitas dos meses 4, 5, 6, 7. Outras diferenças encontradas foram dos meses 6, 7 e 9, quando os anticorpos estavam baixos, com os meses 11 e 12, quando os títulos de anticorpos sinalizaram uma provável indução por infecção.

5.2.2 Propriedade B

Para a propriedade B, os títulos de anticorpos provenientes da análise dos soros dos 10 bezerros estão na tabela 4. De uma maneira geral, observando os dados das médias dos bezerros, ficou evidente que houve um aumento dos títulos de anticorpos

após o nascimento até o décimo quinto dia de idade (0,78 para 0,89). Após esse período, ocorreu uma diminuição mensal dos títulos de anticorpos destes animais, do primeiro mês (0,70) até o quinto mês de idade (0,31). Do sexto mês ao oitavo mês, os animais não apresentaram títulos para o BRSV, porém do nono mês até o décimo segundo mês, os títulos de anticorpos foram aumentando mensalmente de maneira discreta de 0,30 até 0,46. Esse processo está esquematizado na figura 3.

Pela análise dos dados individuais de cada bezerro desta propriedade, a menor persistência de anticorpos colostrais foi de 1 mês (bezerro 1), e a maior, 6 meses (bezerro 3, 7 e 9), com média de 4,7 meses entre os animais que se tornaram negativos ao longo do estudo. Os bezerros de número 2, 4 e 6 em nenhum momento foram negativos no teste, o que impossibilita prever o momento em que deixaram de apresentar anticorpos de origem materna e passaram a ter uma elevação em seus títulos de anticorpos pela possível indução antigênica, sendo esses dados também similares aos encontrados por BAKER et al. (1986). Entretanto, mesmo possuindo a maior prevalência de BRSV (84,4%), na propriedade B, os bezerros não apresentaram títulos de anticorpos mais elevados do que os títulos das outras duas propriedades. Pela análise mensal das médias dos títulos, houve 3 meses (6, 7 e 8) em que a média mostrou ser menor que 0,30, ou seja, teste negativo. Também foi encontrado nesta propriedade o menor tempo de duração dos anticorpos de origem colostrais (bezerro 1), que durou só no primeiro mês de idade. Após o desaparecimento dos anticorpos colostrais e transcorrido o período de ausência de anticorpos, foram detectados títulos somente a partir do nono mês, que aumentaram paulatinamente até o último mês da pesquisa. De acordo com os registros, nesta propriedade alguns animais tinham apresentado problemas respiratórios, porém em menor intensidade que os da propriedade A, ocasião em que foi usada a mesma medicação para controle de infecções secundárias. De acordo com diversos pesquisadores (BOHLENDER et al., 1982; Cancellotti & Carlotto, 1980 citado por BAKER et al., 1986; VERHOEFF & VAN NIEUSTADT, 1984), a indução de anticorpos contra o BRSV em bezerros pode ocorrer sem que os animais apresentem doença clínica, ou seja, é mais comum a forma subclínica. Pode-se então supor que os animais em questão entraram em contato com

Tabela 4. Títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV, determinados em amostras sanguíneas de bezerros nascidos na propriedade B, município de Altinópolis, Estado de São Paulo.

Número de identificação dos bezerros	Idade dos bezerros														
	1d	2d	15d	1m	2m	3m	4m	5m	6m	7m	8m	9m	10m	11m	12m
1	0,60	0,74	0,60	0,30	N	N	N	N	N	N	N	N	0,30	0,30	0,30
2	0,60	0,60	0,85	0,90	0,60	0,43	0,30	0,30	0,30	0,43	0,30	0,60	0,60	0,60	0,60
3	1,20	1,20	1,20	1,20	0,90	0,74	0,60	0,30	0,30	N	N	N	N	0,60	0,60
4	0,60	1,04	0,60	0,30	0,60	0,43	0,60	0,30	0,43	0,30	0,30	0,30	0,30	0,60	0,43
5	1,51	1,51	1,34	1,20	1,20	0,60	0,60	0,43	N	N	0,30	0,60	0,60	0,43	0,43
6	0,60	0,90	0,90	0,74	0,30	0,43	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,60	0,60
7	1,04	0,90	1,04	0,74	0,60	0,60	0,60	0,43	0,30	N	N	N	0,30	0,30	0,43
8	0,60	0,74	0,60	0,43	0,60	0,30	0,30	N	N	N	N	0,30	0,30	0,43	0,60
9	0,30	0,60	1,20	0,60	0,30	0,30	0,74	0,43	0,43	N	N	N	0,30	0,30	0,30
10	0,74	0,60	0,60	0,60	0,30	0,43	0,60	0,60	N	N	N	0,30	0,43	0,43	0,30
Média	0,78	0,88	0,89	0,70	0,54	0,43	0,46	0,31	0,21*	0,10*	0,12*	0,30	0,37	0,43	0,46
								(N)	(N)	(N)	(N)				

* Títulos menores que 0,30 são considerados negativos na prova de VN.

d – dias

m – meses

N – negativo

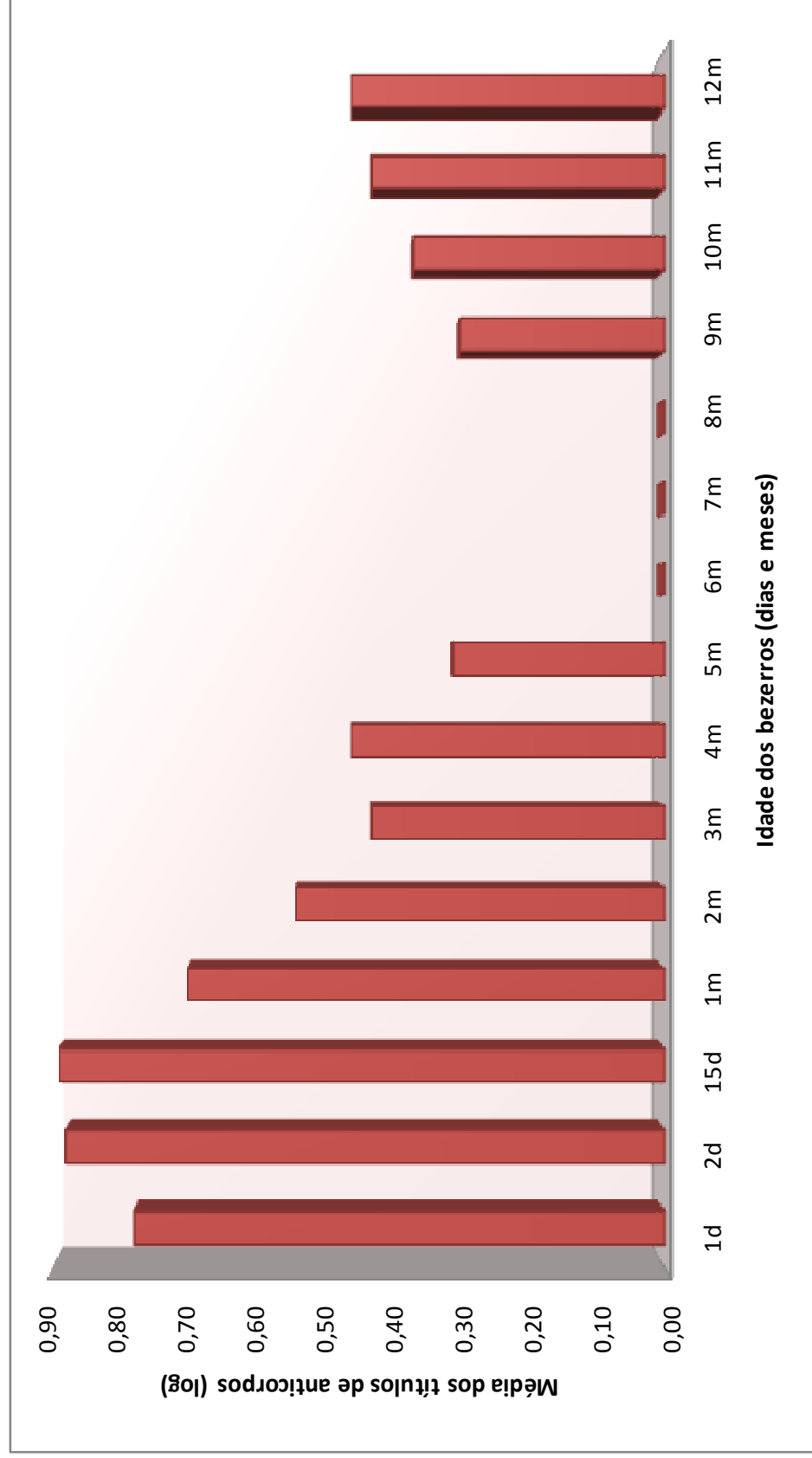


Figura 3. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros pertencentes à propriedade B, município de Altinópolis, Estado de São Paulo.

o vírus, soroconverteram, mas só alguns apresentaram sinais clínicos.

Pela análise estatística, houve diferença significativa entre a colheita realizada no primeiro dia e as colheitas dos meses 5, 6, 7, 8 e 9, mas não houve diferença significativa com as colheitas dos dias 2 e 15 e dos meses 1, 2, 3, 4, 10, 11 e 12. O teste também encontrou diferenças significativas entre as colheitas do dia 2 e 15 e os meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, não sendo diferente do primeiro dia e dos meses 1 e 2. Em ambos os casos, as primeiras colheitas tinham títulos maiores de anticorpos quando comparadas às demais. O mesmo também ocorreu com a colheita do primeiro mês, que foi diferente dos meses 5, 6, 7, 8 e 9 e não foi diferente das demais colheitas. Portanto, as diferenças apontam que as primeiras quatro colheitas, nos dias 1, 2, 15 e no primeiro mês, tiveram títulos maiores que os meses 5, 6, 7, 8 e 9, idade em que a maioria dos animais apresentou títulos de anticorpos muito baixos ou foram negativos.

5.2.3 Propriedade C

No tocante à propriedade C, houve uma diferença marcante, pois, analisando os títulos de anticorpos apresentados pelos bezerros, em nenhum momento foi constatada total ausência de anticorpos (tabela 5). Representadas graficamente na figura 4, as médias dos títulos de anticorpos dos bezerros mostraram que houve uma tendência crescente até os 15 dias (0,90 para 0,99) e depois decrescente do primeiro mês até o quinto mês (0,83 para 0,31), com ligeiro aumento no quarto mês de idade (0,45). No quinto e sexto meses, os títulos permaneceram constantes (0,31), sem indicação de desaparecimento dos anticorpos, para, em seguida, já no sétimo mês (0,48), ocorrer um aumento nos títulos de forma crescente até o nono mês de idade dos bezerros (0,66). No décimo mês houve uma queda nesses títulos (0,52) e logo nos meses seguintes (décimo primeiro e segundo) os títulos voltaram a subir e tornaram a diminuir (respectivamente 0,62 e 0,57). De acordo com a análise dos dados individuais dos bezerros da propriedade C, a maioria dos animais (números 2, 3, 4, 5, 6, 7) em nenhum momento tornou-se negativa. Como já mencionado anteriormente, também neste caso, fica impossível distinguir anticorpos de origem materna daqueles provenientes de uma

Tabela 5. Títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros nascidos na propriedade C, município de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Número de identificação dos bezerros	Idade dos bezerros														
	1d	2d	15d	1m	2m	3m	4m	5m	6m	7m	8m	9m	10m	11m	12m
1	N	N	0,43	0,43	0,30	0,30	0,30	N	N	0,30	0,30	0,90	1,20	1,20	1,20
2	1,20	1,20	1,35	1,04	0,74	0,43	0,60	0,74	0,43	0,60	0,74	0,43	0,30	0,74	0,43
3	0,60	1,04	1,51	1,04	1,04	0,43	0,43	0,43	0,43	0,30	0,30	0,60	0,43	0,30	0,30
4	0,90	0,85	0,74	0,60	0,74	0,43	0,60	0,74	0,60	0,43	0,60	0,90	0,43	0,43	0,43
5	1,20	1,20	1,20	0,85	0,60	0,60	0,60	0,60	0,30	0,30	0,43	0,74	0,30	0,43	0,30
6	0,74	0,74	0,60	0,60	0,60	0,43	0,43	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,43	0,60	0,60
7	1,95	2,11	1,95	1,65	1,17	0,90	0,90	0,30	0,30	0,90	0,74	0,60	0,90	0,74	0,60
8	0,60	0,74	0,60	0,43	0,60	0,30	0,30	N	0,43	1,04	0,90	0,74	0,52	0,60	0,60
9	0,43	0,43	0,60	0,60	0,60	0,30	0,30	N	0,30	0,60	0,60	0,60	0,43	0,60	0,60
10	1,35	1,20	0,90	1,04	0,90	0,30	N	N	N	N	1,20	0,74	0,30	0,60	0,60
Média	0,90	0,95	0,99	0,83	0,73	0,44	0,45	0,31	0,31	0,48	0,61	0,66	0,52	0,62	0,57

d – dias
m – meses
N – negativo

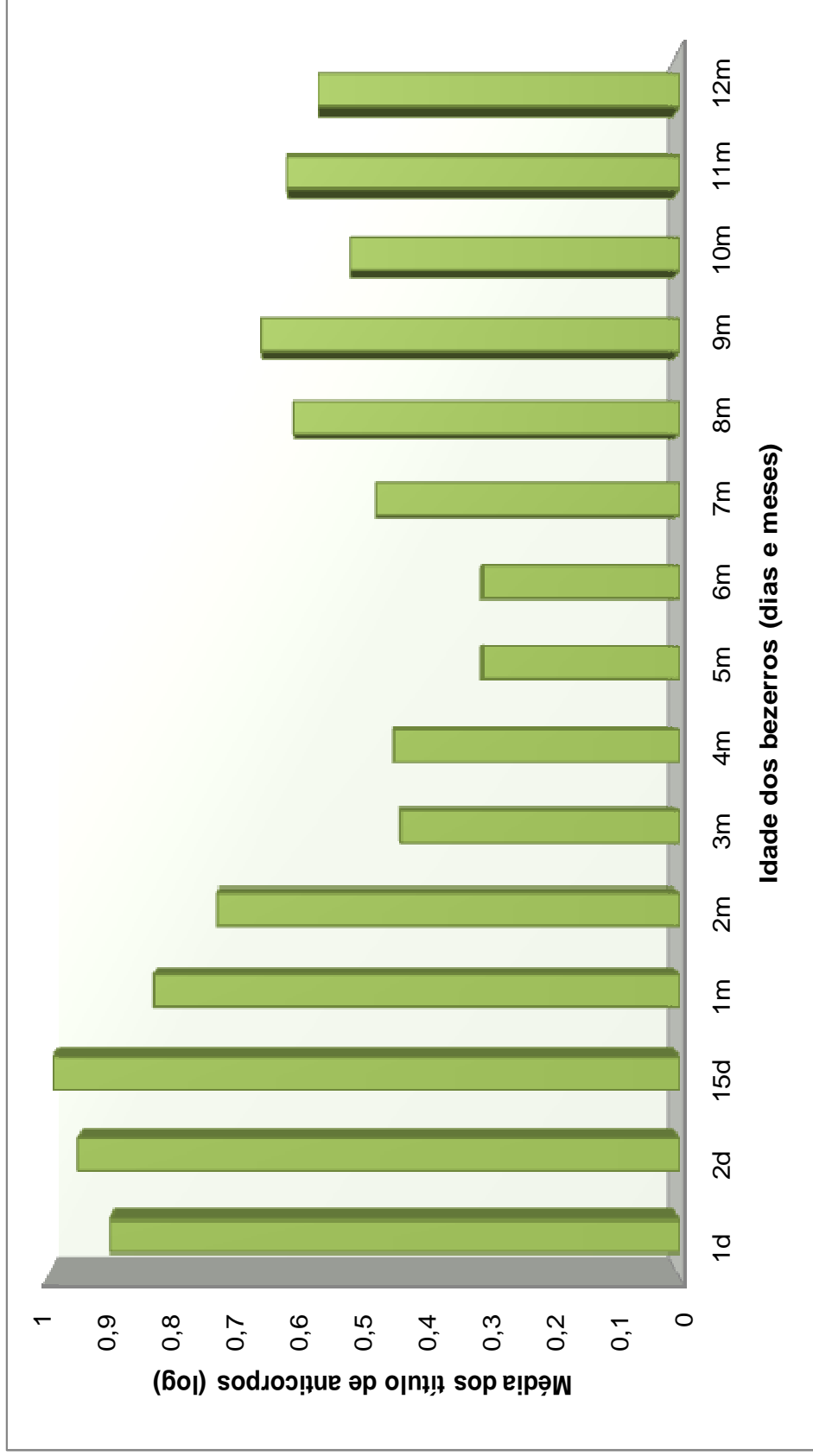


Figura 4. Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BRSV determinados em amostras sanguíneas de bezerros pertencentes à propriedade C, município de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

suposta infecção. Porém, alguns bezerros tornaram-se negativos no teste em algum momento da pesquisa (números 1, 8, 9 e 10), cujo período mínimo encontrado de permanência de anticorpos colostrais foi de 3 meses, e o máximo, de 4 meses, com tempo médio de 3,7 meses. Nesta propriedade, os animais apresentaram esporadicamente sinais clínicos de doença respiratória, sendo estes observados também em todas as idades.

Para BAKER et al. (1986), os anticorpos maternos não são capazes de proteger os bezerros contra uma infecção pelo BRSV. Por essa premissa, pode ter ocorrido uma suposta infecção nos bezerros dessa propriedade, mesmo na presença de anticorpos maternos. Segundo KIMMAN et al. (1988), mesmo sendo os títulos de anticorpos altos ou moderados, há a possibilidade de ocorrência de infecção. Outro estudo desses mesmos autores relata que a maioria dos casos clínicos associados ao BRSV ocorreram em animais com idade entre 1 e 3 meses, período em que praticamente quase todos os animais ainda possuíam anticorpos de origem colostrais.

A análise estatística nesta propriedade mostrou pouca diferença dos resultados laboratoriais entre as colheitas, sendo as significativas das três primeiras, que possuíam maiores títulos de anticorpos, nos dias 1, 2 e 15, e as colheitas dos meses 3, 4 e 5, os quais apresentaram menores títulos. As colheitas dos meses 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 não tiveram diferenças estatísticas significativas.

5.2.4 Comparação estatística entre as propriedades

Como o monitoramento de anticorpos foi realizado nas três propriedades usando o mesmo protocolo de acompanhamento, ou seja, exame dos animais com idades idênticas, repetiu-se o teste estatístico para comparar a colheita de uma propriedade com a colheita das outras. Deste modo, os títulos de anticorpos do primeiro dia das propriedades A, B e C foram comparados entre si, assim como todos os outros. De acordo com o ANOVA e o teste de Tukey, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$), no mês 7, entre as propriedades B e C, sendo a média dos títulos maior na C; no mês 8, da propriedade A com C e B com C, com títulos maiores na propriedade C;

e, no mês 9, da propriedade A com C e B com C, com a propriedade C apresentando maiores títulos. Como na propriedade C, de acordo com a média, não houve período de ausência de anticorpos de origem colostrar, o teste estatístico só confirmou a significância da diferença entre ela e as demais propriedades quando os anticorpos estavam ausentes ou em baixos títulos.

5.3 Perspectiva da atividade viral

Por meio do uso da sorologia, principalmente realizada em etapas pareadas, pode-se avaliar respostas de indução de anticorpos, inclusive com caracterização de infecção recente ou até mesmo de infecções antigas, nas quais o agente etiológico pode não estar mais presente no rebanho. Sendo assim, a sorologia pareada em animais jovens pode mostrar a mais recente atividade do agente no rebanho, fato este que torna-se mais complicado quando em animais adultos. Conforme dados de MOREIRA (2004), a atividade viral do BoHV-1 nas mesmas propriedades deste estudo não foi evidenciada, pois os anticorpos monitorados nos primeiros meses de vida dos bezerros estavam relacionados à transferência passiva por meio do colostro. Depois, no decorrer da pesquisa realizada até os 12 meses, os animais tornaram-se negativos, permanecendo não reagentes até o final. Neste caso, a autora pôde deduzir que a prevalência encontrada para o BoHV-1 que caracterizou as propriedades A, B e C foram decorrentes de anticorpos de memória, só que não havia disseminação viral, pelo menos entre os bezerros.

Diferentemente para o BRSV, a disseminação viral foi evidenciada pela monitoração de anticorpos nos bezerros, pois nas três propriedades houve aumento dos níveis de anticorpos nos meses finais de estudo, depois da diminuição característica dos anticorpos de origem colostrar. Apesar da presença de fatores de risco para o BRSV, nas propriedades A e B os anticorpos colostrais parecem ter contribuído para a proteção dos bezerros, postergando a infecção por um período de tempo maior. Já para a propriedade C, os anticorpos de origem colostrar não tiveram a

mesma capacidade de conter a infecção, pois a média dos títulos diminuiu sem desaparecer totalmente e voltou a aumentar.

Por fim, pode-se constatar que existiram fatores de risco que facilitaram o desenvolvimento do BRSV, só que o BoHV-1 não esteve atuante nesse processo, pelo menos nas três propriedades acompanhadas no presente estudo.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente estudo em três fazendas leiteiras, localizadas na região noroeste do Estado de São Paulo, foi possível concluir que:

- não foi evidenciada associação entre as prevalências do BRSV e do BoHV-1 nas propriedades estudadas;
- as diferenças encontradas nas prevalências do BRSV foram dependentes da intensidade dos fatores de risco facilitadores ou predisponentes;
- a constatação do declínio natural dos anticorpos de bezerros monitorados sorologicamente para o BRSV ao longo do tempo, desde o nascimento, permitiu estabelecer a duração da imunidade de origem colostrar;
- a detecção de títulos crescentes de anticorpos contra o BRSV, após o declínio de anticorpos de origem colostrar nos bezerros monitorados, é um fator que comprova a atividade fluente da infecção pelo BRSV entre os animais, em todas as propriedades.

7. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of the bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latent infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 36-40, 1982.

ALMEIDA, R. S.; DOMINGUES, H. G.; SPILKI, F. R.; LARSEN, L. E.; HAGGLUND, S.; BELAK, S.; ARNS, C. W. Circulation of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Veterinary Record**, Londres, v. 158, n. 18, p. 632-634, 2006.

ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; LEITE, R. C.; MOREIRA, E. C.; REIS, R. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos nos estados de Minas gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemoaglutinação passiva. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 5, p. 433-441, 1989.

ARNS, C. W. Vírus Respiratório Sincicial dos Bovinos (BRSV): Situação no Brasil. In: SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1., 1996, Guarulhos. **Anais...** p. 37-39.

ARNS, C. W.; CAMPALANS, J.; COSTA, S. C. B.; DOMINGUES, H. G.; D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S. Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 2, p. 213-218, 2003.

ASTUDILLO, V. M. **Encuestas por muestreo para estudios epidemiológicos en poblaciones animales**. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Rio de Janeiro: Editora Panamericana, 1979. p. 18-24.

BAKER, J. C. The characteristics of respiratory syncytial viruses. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 88, p. 1190-1195, 1993.

BAKER, J. C.; AMES T. R.; MARKHAM R. J. F. Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 891-892, 1985.

BAKER, J. C.; AMES, T. R.; BELKNAP, E. B.; DUBOVI, E. J.; BRYSON, D. G.; KELLING, C. L. BRSV (bovine respiratory syncytial virus) infection: its pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 88, p. 880-906, 1993.

BAKER, J. C.; AMES, T. R.; MARKHAM, R. J. F. Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 240-245, 1986.

BAKER, J. C.; EVERMANN, J. F.; FREY, M. L.; HUTCHINS, S.; LEHMKUHL, H.; MERCER, B.; MOCK, R. E.; POTGIETER, L.; SHARP, A.; TORRES, A. A closer look at bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 81, p. 947-956, 1986a.

BAKER, J. C.; FREY, M. Bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 1, n. 2, p. 259-272, 1985.

BLOOD, D. C. Atypical interstitial pneumonia of cattle. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 3, n. 2, p. 40-47, 1962.

BOHLENDER, R. E.; MCCUNE, M. W.; FREY, M. L. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Modern Veterinary Practice**, Santa Barbara, v. 63, p. 613-618, 1982.

BRYSON, D. G.; M. S. MCNULTY, M. S.; LOGAN, E. F.; CUSH, P. F. Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: clinical and pathologic findings. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, p. 1648-1654, 1983.

BRYSON, D. G.; MCFERRAN, J. B.; BALL, H. L.; NEILL, S. D. Observations on outbreaks of respiratory disease in calves associated with parainfluenza type 3 virus and respiratory syncytial virus infection. **Veterinary Record**, Londres, v. 104, n. 3, p. 45-49, 1979.

CAMPALANS, J; ARNS, C. W. Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1-2, p. 50-56, 1997.

CEPAGRI. **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br>>. Acesso em: 7 set 2009.

COLLINS, J. K.; JENSEN, R.; SMITH, G. H.; FLACK, D. E.; KERSCHEN, R.; BENNETT, B. W.; JONES, R. L.; ALEXANDER, A. F. Association of bovine respiratory syncytial virus with atypical interstitial pneumonia in feedlot cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 7, p. 1045-1049, 1988.

COLLINS, P. L.; WERTZ, G. W. Human respiratory syncytial virus genome and gene products. In: NOTKINS, A. L.; OLDSTONE, M. B. A. (Eds.). **Concepts in viral pathogenesis II**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 40-46.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista de Educação Continuada CRMV- SP**, São Paulo, v. 5, fascículo 3, p. 300-312, 2002.

DEL FAVA, C. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR/IPV). **Boletim do Leite**, Piracicaba, n. 25, 1996.

DOMINGUES, H. G. **Vírus Respiratório Sincicial Bovino: padronização e comparação de técnicas sorológicas**. 2000. 62f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M. J. P.; MOOJEN, V.; ARNS, C. W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; DACOSTA, U. M. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p. 77-81, 1997.

DUBOVI, E. J. Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.13, p.888-893, 1993.

DUNGWORTH, D. L. The respiratory system. In: JUBB, K. V. E., KENNEDY, P. C., PALMER, N. (Eds.). **Patology of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 539-699.

DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 31, p. 815-820, 1990.

FULTON, R. W.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; PERINO, L. J.; D'OFFAY, J. M.; PAYTON, M. E.; MOCK, R. E. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. **Vaccine**, Kidlington, v.13, n.8, p.725-733, 1995.

FULTON, R. W.; PURDY, C. W.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; LOAN, R. W.; BRIGGS, R. E; BURGE, L. J. Bovine viral diarrhea infection in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus and bovine respiratory syncytial virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 64, n. 3, p. 151-159, 2000.

GERSHWIN, L. J.; SCHELEGLE, E. S.; GUNTHER, R. A.; ANDERSON M. L.; WOOLUMS, A. R.; LAROCHELLE, D. R.; BOYLE, G. A.; FRIEBERTSHAUSER, K. E.; SINGER, R. S. A bovine model of vaccine enhance respiratory syncytial virus patophysiology. **Vaccine**, Kidlton, v. 16, n. 11-12, p. 1225-1236, 1998.

GONÇALVES, I. P. D.; SIMANKE, A. T.; JOST, H. C.; HÖTZEL, I.; DAL SOGLIO, A.; MOOJEN, V. Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 3, p. 389-390, 1993.

HAGE, J. J.; SCHUKKEN, Y. H.; BARKEMA, H. W. Population dynamics of bovine herpes 1 infection in a dairy herd. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.53, n. 1-2, p. 317-343, 1996.

HALL, C. B.; DOUGLAS, R.G. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 99, n. 1, p. 100-103, 1981.

HOERLEIN, A. B. Preconditioning of beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 163, p. 825-827, 1973.

HUANG, Y. T.; WERTZ, G. W. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. **The Journal of Virology**, Washington, v. 43, n. 1, p. 150-157, 1982.

INABA, Y.; TANAKA, Y.; OMORI, T.; MATUMOTO, M. Isolation of Bovine Respiratory Syncytial Virus. **Japanese Journal of Experimental Medicine**. Tokyo, v. 40, n. 6, p. 473-474, 1970.

KARGER, A.; SCHIMIDT, U.; BUCCHOLZ, U. J. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. **Journal of General Virology**, Londres, v. 82, n. 3, p. 337-345, 2001.

KIMMAN T, G.; ZIMMER, G. M.; WESTENBRINK, F.; MARS, J.; VANLEEUVEN, E. Epidemiological-study of bovine respiratory syncytial virus-infections in calves: Influence of maternal antibodies on the outcome of disease. **Veterinary Record**, Londres, v. 123, v. 4, p. 104-109, 1988.

KIMMAN, T. G.; TERPSTRA, G. K.; DAHA, M. R.; AND F. WESTENBRINK, F. Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves. Evidence for the involvement of complement and mast cell mediation. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 694-700, 1989.

KIMMAN, T. G.; WESTENBRINK, F. Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. **Archives of Virology**, New York, v. 112, n. 1-2, p. 1-25, 1990.

KIMMAN, T. G.; WESTENBRINK, F.; STRAVER, P. J. Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 145-160, 1989a.

KRUGER, E. R.; KANTER, C. E.; PINTO, M. A. Presença de anticorpos neutralizantes contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em gado leiteiro na região de Curitiba, PR. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.75, p.30-32, 1991.

LARSEN, L. E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 41, n. 1, p. 1-24, 2000.

MAHIN, L.; SHIMI, A. Weather and BRSV infection. **Veterinary Record**, Londres, v. 111, n. 4, p. 87, 1982.

MOREIRA, S. P. G. **Avaliação do desenvolvimento ponderal de bezerros em plantéis leiteiros infectados pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. 2004, 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

MOREIRA, S. P. G.; SAMARA, S. I.; ARITA, G. M. M.; FERREIRA, F.; PEREIRA, G. T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 3, 127-130, 2001.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus taxonomy. **Archives of Virology**, New York, Suppl. 10, p. 268-274, 1995.

NORSTRÖM, M.; SKJERVE, E.; JARP, J. Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.44, n. 1, p. 87-96, 2000.

OBANDO, R. C.; HIDALGO, M.; MERZA, M.; MONTROYA, A.; KLINGEBORN, B.; MORENO, L.J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 271-278, 1999.

ODEGAARD, Q. A.; KROGSRUD, J. A field outbreak caused by bovine respiratory syncytial virus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 18, p. 429-431, 1977.

OIE. Office International des Épidémiologies. **International animal health code**. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 2 fev 2004.

OIE. Office International des Épidémiologies. **Manual of standards for diagnostic test and vaccines**. Disponível em:<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.13_IBR_IPV.pdf>. Acesso em: 8 ago 2009.

OKUDA, L. H.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; STEFANO, E.; DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Inquérito soro-epidemiológico do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no município de Monte Negro, Estado de Rondônia, Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 103-105, 2006.

PACCAUD, M. F.; JACQUIER, C. L. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Archiv fuer die Gesamte Virusforschung**, Vienna, v. 30, n. 4, p. 327-342, 1970.

PEIXOTO, P. V.; MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; DE SOUZA, M. I. Infecção natural pelo vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 171-175, 2000.

PIRIE, H. M.; PETRIE, L.; PRINGLE, C. R.; ALLEN, E. M.; KENNEDY, G. J. Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus. **Veterinary Record**, Londres, v. 108, n. 19, p. 411-416, 1981.

POTGIETER, L. N. D.; ALDRIDGE, P. L. Use of the indirect fluorescent antibody test in the detection of bovine respiratory virus antibodies in bovine serum. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 38, p. 1341-1343, 1977.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 645-647, 2001.

SOLÍS-CALDERÓN, J. J.; SEGURA-CORREA, J. C.; AGUILAR-ROMERO, F.; SEGURA-CORREA, V. M. Detection of antibodies and risk factors for infections with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 102-110, 2007.

SPIILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S.; DOMINGUES, H. G.; D'ARCE, R. C. F.; FERREIRA, H. L.; CAMPALANS, J.; COSTA, S. C. B.; ARNS, C. W. Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. **Virus Research**, Amsterdam, v. 116, p. 161-168, 2006.

SPIILKI, F. R.; ARNS, C. W. Vírus respiratório sincicial bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 3, p. 197-214, 2008.

STOTT, E. J.; TAYLOR, G. Respiratory syncytial virus: brief review. **Archives of Virology**, New York, v. 84, p. 1-52, 1985.

STOTT, E. J.; THOMAS, L. H.; COLLINS, A. P.; CROUCH, S.; JEBBETT, J.; SMITH, G. S.; LUTHER, P. D.; CASWELL, R. A survey of virus infections of the respiratory tract of

cattle and their association with disease. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 85, p. 257-270, 1980.

TAYLOR, G.; STOTT, E. J.; HUGHES, M.; COLLINS, A. P. Respiratory syncytial virus infection in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 43, n. 2, p. 649-655, 1984.

TRUDEL, M.; NADON, F.; SIMARD, C.; BELANGER, F.; ALAIN, R.; SEGUIN, C.; LUSSIER, G. Comparison of Caprine, Human and Bovine Strains of Respiratory Syncytial Virus. **Archives of Virology**, New York, v. 107, n. 1-2, p. 141-149, 1989.

VALARCHER, J. F.; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.38, n. 2, p. 153-180, 2007.

VAN DER POEL, W. H.; SCHRIJVER, R. S.; MIDDEL, W. G.; KRAMPS, J. A.; BRAND, A.; VAN OIRSCHOTVAN, J. T. Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 18, n. 3, p. 81-86, 1996.

VAN DONKERSGOED, J.; BABIUK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.86, p.86-94, 1991.

VAN VUUREN, M. Bovine respiratory syncytial virus infection. In: COETZ, J. A.W., THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Eds.). **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford: University Press, Cape Town, p. 769-772, 1994.

VERHOEFF, J.; VAN NIEUSTADT, A. BRS virus, PI3 virus and BHV-1 infections of young stock on self-contained dairy farms: epidemiological and clinical findings. **Veterinary Record**, Londres, v. 114, p. 288-293, 1984.

YESILBAG, K.; GÜNGÖR, B. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-western Turkey. **Tropical Animal Health Production**, Edinburgh, v. 40, n. 4, p. 55-60, 2008.

