

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

**ANTICORPOS VIRUSNEUTRALIZANTES PARA OS
GENÓTIPOS 1 e 2 DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA
EM VACAS GESTANTES ABATIDAS EM FRIGORÍFICO
E RESPECTIVOS FETOS**

Mônica Costa Oliveira
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2009

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

**ANTICORPOS VIRUSNEUTRALIZANTES PARA OS
GENÓTIPOS 1 e 2 DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA
EM VACAS GESTANTES ABATIDAS EM FRIGORÍFICO
E RESPECTIVOS FETOS**

Mônica Costa Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

Co-Orientador: Dr. Fábio Carvalho Dias

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 2009

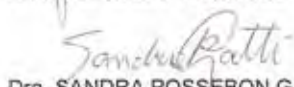
Oliveira, Mônica Costa
O48a Anticorpos virusneutralizantes para o genótipo 1 e 2 do vírus da diarreia viral bovina em vacas gestantes abatidas em frigorífico e respectivos fetos / Mônica Costa Oliveira. -- Jaboticabal, 2009 xi, 44 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Samir Issa Samara
Banca examinadora: José Gabriel Amoril, Sandra Possebon Gatti
Bibliografia

1. Vírus diarreia viral bovina. 2. Bovinos. 3. Virusneutralização.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988:636.2

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

unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO****TÍTULO:** ANTICORPOS VIRUSNEUTRALIZANTES PARA OS GENÓTIPOS 1 E 2
DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM VACAS GESTANTES
ABATIDAS EM PRIGORÍFICO E RESPECTIVOS FETOS**AUTORA:** MÔNICA COSTA OLIVEIRA**ORIENTADOR:** Dr. SAMIR ISSA SAMARA
Co-Orientador(a): Dr. FABIO CARVALHO DIASAprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA
VETERINÁRIA área de MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:
Dr. SAMIR ISSA SAMARA
Dr. JOSÉ GABRIEL AMORIL
Dra. SANDRA POSSEBON GATTI

Data da realização: 16 de fevereiro de 2009.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. SAMIR ISSA SAMARA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mônica Costa Oliveira – Médica Veterinária nascida na cidade de Itajubá – Minas Gerais, em 8 de Janeiro de 1982. Filha de Fernando de Oliveira e Maria Rita Costa Oliveira. Ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Barão de Mauá, no ano de 2000 e concluiu-o em dezembro de 2004. Trabalhou em Clínica Veterinária no ano de 2006. Em março de 2007 iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, (Medicina Veterinária Preventiva) ficando lotada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) no Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Samir Issa Samara.

Dedico

Aos meus queridos pais Fernando e Maria Rita responsáveis pela minha motivação em busca do aperfeiçoamento e de todas as vitórias conquistadas, sem vocês eu nada seria.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pois tudo posso naquele que me fortalece.

A minha grande família que foi a base para que tudo desse certo, aos meus irmãos Sara, Daniel e Marcelo pelo apoio e incentivo.

Ao meu querido orientador pela oportunidade, confiança, paciência e principalmente pelo aprendizado que me foi passado.

Ao meu co-orientador, por ter me apresentado ao BVDV pela amizade, paciência e os ensinamentos.

A técnica do laboratório Andréa, pela amizade, carinho, paciência e disposição em ensinar e esclarecer as dúvidas que iam surgindo, você é muito querida por todos.

As minhas “irmãzinhas” de laboratório; Bruna pelos ensinamentos, amizade, paciência e momentos de descontração, a Ingrid, que contribuiu imensamente com o desfecho do trabalho, pela paciência, amizade e incentivo nos momentos difíceis. Ao Rafael e Igor pela amizade e a querida amiga Lucimara pinga, pela imensa ajuda.

Ao meu companheiro Marcelo pelo incentivo, amor, carinho e a sua imensa compreensão nos momentos difíceis.

As amizades que foram cultivadas de amigos queridos que me deram apoio, ajuda e me animavam nos piores momentos Roberta, Vivi, Camilo, Bel, Poliana, Suzy, Fernanda, Fer e Thaís e a tantos outros amigos Josie, Pâmela, Rafa, Ellen, Paula pela torcida.

Aos professores do departamento, pela ajuda e o excelente convívio.

A banca de qualificação pela colaboração e melhoria da dissertação prof. Maria da Glória Buzinaro pelos ensinamentos, paciência e amizade e a prof. Ângela pela ajuda.

A banca de defesa prof. Dra Sandra Possebon Gatti e José Gabriel Amoril pela imensa contribuição desse trabalho e pelos ensinamentos.

A todos os técnicos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que estavam sempre dispostos a ajudar, Assis, Zé, Cidinha, Giba, Lilá, e a secretária Marisa pela disposição.

Aos funcionários do Instituto Biológico, Cláudia Pestana, Ricardo, Dra. Maria Estela, pela oportunidade do treinamento técnico e pelos ensinamentos a mim passados.

Aos veterinários do frigorífico Andre e Fernando pela disposição e vontade de ajudar, sem vocês nada disso seria possível.

As amigas de apartamento Ketty e Livia pela grande amizade e convívio.

E a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente o meu eterno obrigado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1 REVISÃO DE LITERATURA	01
2 OBJETIVO.....	08
2.1 Objetivo geral.....	08
2.1.2 Objetivos específicos.....	08
3 MATERIAL E MÉTODOS	09
3.1 Animais de experimentação.....	08
3.1.2 Colheita de Sangue	11
3.2 Teste sorológico de Virusneutralização.....	12
3.2.1 Manutenção das culturas celulares	12
3.2.2 Multiplicação do vírus padrão	13
3.2.3 Titulação Viral	14
3.2.4 Pesquisa dos anticorpos virusneutralizantes.....	15
3.2.5 Controle das TCID ₅₀	16
3.3 Análise Estatística.....	17
4 RESULTADOS.....	17
4.1 Análise da sorologia genotípica.....	17
4.2 Análise da sorologia fetal.....	18
4.3 Análise da distribuição geográfica.....	23
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES	34
7 REFERÊNCIAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabelas		Página
1.	Origem dos rebanhos, número de amostras e datas das respectivas colheitas de material sanguíneo de vacas gestantes e respectivos fetos abatidos em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.....	09
2.	Detecção de anticorpos virusneutralizantes para os genótipos do BVDV-1 e do BVDV-2 em soro de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.....	19
3.	Título dos anticorpos virusneutralizantes para os genótipos do BVDV-1 em soro positivo de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.....	20
4.	Título dos anticorpos virusneutralizantes para os genótipos do BVDV-2 em soro positivo de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.....	21
5.	Títulos dos anticorpos virusneutralizantes para ambos os genótipos BVDV-1 e BVDV-2 em soro positivos de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.....	22
6.	Animais positivos sobre os testados, de acordo com as colheitas, no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV- 1 e BVDV-2 realizado após abate em frigorífico do Estado de São Paulo durante o período de abril a junho de 2008.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Origem dos rebanhos da primeira colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV-1 e o genótipo do BVDV-2, realizado após abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 11 de abril de 2008.....	26
2. Origem dos rebanhos da segunda colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV-1 e o genótipo do BVDV-2, realizado após abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 25 de abril de 2008.....	27
3. Origem dos rebanhos da terceira colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV-1 e o genótipo do BVDV-2, realizado após abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 21 de maio de 2008.....	28
4. Origem dos rebanhos da quarta colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV-1 e o genótipo do BVDV-2, realizado após abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 13 de junho de 2008.....	29

ANTICORPOS VIRUSNEUTRALIZANTES PARA OS GENÓTIPOS 1 E 2 DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM VACAS GESTANTES ABATIDAS EM FRIGORÍFICO E RESPECTIVOS FETOS

RESUMO - O Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) é um dos patógenos mais importantes na pecuária bovina em todo mundo, principalmente por desencadear manifestações clínicas relacionadas à esfera reprodutiva. A infecção em fêmeas gestantes pode resultar em abortamentos, reabsorções embrionárias, mumificações fetais, má formações e nascimento de bezerros fracos além do aparecimento de animais persistentemente infectados e imunotolerantes ao vírus, que são a principal fonte de infecção e disseminação da doença nos rebanhos. Atualmente, a complexidade do diagnóstico e conseqüentemente a patogenia, estão relacionados às diferenças genótípicas do agente. Por isso, a presente pesquisa teve como objetivo verificar a ocorrência dos genótipos BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 (VS-253) em vacas, e respectivos fetos, abatidas em um frigorífico no Estado de São Paulo por meio da análise do soro sanguíneo por meio da técnica de virusneutralização. No contexto geral, 52,51% (115/219) das vacas testadas foram reagentes, mas nenhum feto (0/219) reagiu na virusneutralização. Pela análise cruzada conforme a estirpe viral, observou-se que 42% (92/219) das vacas foram reagentes tanto para o genótipo BVDV-1 como para o genótipo do BVDV-2. Por outro lado 4,10% (9/219) reagiram apenas para o genótipo BVDV-1 e 6,39% (14/219) reagiram apenas para o genótipo do BVDV 2. Notou-se portanto que ambas as estirpes estão disseminadas nas regiões estudadas, fato que justifica o emprego de antígenos diferentes para evitar diagnóstico falso-negativo. Por fim, não foi observado qualquer alteração nos fetos que pudessem ser caracterizada como patologia da enfermidade.

Palavras-chave: vírus da diarréia viral bovina (BVDV), bovinos, virusneutralização

Neutralizing antibodies to 1 and 2 genotypes of the bovine viral diarrhea virus in pregnant cows and their fetuses in a slaughterhouse

SUMMARY – The Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is one of the pathogens in bovine livestock worldwide most important mainly triggered by clinical manifestations related to the reproductive sphere. The infection in pregnant females may result in abortions, embryonic resorptions, fetal mummification, poor training, birth of weak calves in addition to persistently infected and virus immunotolerant animals, which are the main source of infection and spread of the disease. Currently, the complexity to diagnosis and consequently to the pathogenesis are related genotypic differences that he presents. Therefore, this research aimed to verify the occurrence of BVDV-1 (Singer) and BVDV-2 (VS-253) genotypes in cows and their respective fetuses slaughtered in a abattoir at the state of São Paulo by analyzing the blood serum using virusneutralization technique. In the general context, 52.51% (115/219) of cows were reagents, but no fetus (0/219) reacted in virusneutralization. After a cross-examination we observed that 42% (92/219) of cows reacted for both BVDV-1 and BVDV-2 genotype. Furthermore 4,10% (9/219) reacted only to the genotype BVDV-1 and 6,39% (14/219) responded only to the genotype 2 of BVDV. It was noted therefore that both strains are widespread in the regions studied, which also justifies the use of different antigens to avoid false-negative diagnosis. Finally, there was no change in fetuses that could be characterized as a pathology of the disease.

Key-words: bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine, virus neutralization

1. REVISÃO DE LITERATURA

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é caracterizado como um dos principais patógenos que promovem perdas significativas à bovinocultura de corte e leite em todo o mundo e, por isso, é considerado um dos vírus mais importantes de bovinos (BOLIN, 1990; BAKER, 1995), e está amplamente difundido no rebanho brasileiro (OLIVEIRA et al., 1996).

Inicialmente OLAFSON et al., (1946) e CHILDS (1946) descreveram, simultaneamente, essa enfermidade como uma doença entérica de bovinos, sendo mais tarde confirmada a sua etiologia viral e denominada diarreia viral bovina (BVD). Posteriormente, o mesmo vírus foi implicado como causador da doença das mucosas (DM), enfermidade fatal descrita primeiramente por RAMSEY & CHIVERS (1956), sempre precedida de infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), que ocorre em bovinos persistentemente infectados (PI) e imunotolerantes ao vírus (VIDOR, 1974).

O BVDV foi isolado pela primeira vez no Brasil por VIDOR (1974), a partir de amostras de soro bovino colhidas em matadouro, porém no país a enfermidade é pouco conhecida entre os criadores, e até mesmo por alguns médicos veterinários (DIAS & SAMARA, 2003).

O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, juntamente com o vírus da peste suína clássica e o vírus da doença da fronteira ou “border disease” dos ovinos (HORZINEK, 1991). Os vírus do gênero *Pestivirus* são vírus envelopados, com diâmetro entre 40 e 60nm, cujo genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 12,5 kb. Constitui-se ainda de nucleocapsídeo icosaédrico envolto por envelope lipoprotéico contendo três glicoproteínas: E0, E1 e E2 (DONIS, 1995).

Conforme foi observado por GILLESPIE et al., (1960), o BVDV apresenta dois biótipos baseados no efeito da sua replicação em células de cultivo: um citopatogênico (CP) e o outro não-citopatogênico (NCP). Amostras NCP predominam entre os isolados

de campo e estão associadas às diversas manifestações clínicas da infecção; as amostras CP não ultrapassam 5% e são isoladas quase que exclusivamente de animais acometidos pela doença das mucosas, supostamente originárias de estirpes NCP por meio de mutações ou recombinações no genoma (DUBOVI, 1992; GILLESPIE et al., 1960).

A análise de regiões conservadas do genoma viral revelou a existência de dois genótipos distintos: BVDV-1 e BVDV-2 (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994). Amostras de BVDV-2 são antigenicamente distintas das amostras de BVDV-1, sobretudo na região da glicoproteína E2 (gp53) (PELLERIN et al., 1994; VAN RIJN et al., 1997), principal glicoproteína do vírion que também está envolvida na indução de anticorpos neutralizantes (DONIS, 1995). Para RUSH et al. (2001), o genótipo do BVDV-2 é uma forma emergente da doença.

No Brasil já foram identificados os dois genótipos de BVDV (BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 1999), sendo que muitos desses isolados apresentam uma grande variabilidade antigênica, com importantes diferenças que as distingue inclusive das estirpes americanas e européias (BOTTON et al., 1998). Recentemente, o BVDV-1 foi subdividido em 11 subgenótipos de 'a' até 'k' (VILCEK et al.1994) e o BVDV-2 em 2 subgenótipos "a" e "b" (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 2000).

A infecção de animais suscetíveis pelo BVDV pode gerar uma variedade de sinais clínicos, sendo a infecção subclínica a forma mais frequente. Uma das características da infecção é a imunodepressão, tornando os animais suscetíveis a outros patógenos como o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BoHV1), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), *Pasteurella haemolytica*, enterites causadas por *Salmonella*, *Escherichia coli*, além de helmintoses agudas, mastites e metrites (SAMARA et al., 2004). Clinicamente, o BVDV pode produzir síndromes respiratórias, digestivas, reprodutivas, hemorrágicas, assim como a doença das mucosas altamente fatal (BAKER, 1995).

O maior problema da infecção está diretamente ligado a grandes perdas reprodutivas sofridas pelos bovinos, dependendo da fase gestacional e do genótipo viral. Nesse caso os sinais clínicos mais comuns são: reabsorção embrionária, abortos,

mumificação fetal, malformações congênitas e o nascimento de bezerros inviáveis. Caso essas fêmeas entrem em contato com o vírus entre os dias 40 e 120 de gestação, e se infectaram especificamente com amostras de vírus NCP, haverá infecção fetal, pois o vírus possui predileção por células em divisão com o subsequente nascimento de bezerros imunotolerantes ou PI (BROWNLIE, 1990; MOENNIG & LIESS, 1995).

Nesta fase o sistema imunológico do feto atravessa a fase de reconhecimento dos antígenos próprios (DONIS, 1989) resultando em bezerros PI muitas vezes saudáveis e sem anticorpos contra o vírus que os infecta. Estima-se que em regiões endêmicas para o BVDV, bezerros PI nascem a cada 100 a 500 partos (BAKER, 1995; DONIS, 1989).

Os animais PI constituem no ponto central na epidemiologia da infecção pelo BVDV pelos seguintes motivos: são muitas vezes saudáveis; não são facilmente identificáveis por não serem reagentes, representam fontes contínuas e abundantes de vírus para outros animais, eliminam grandes quantidades de vírus em secreções e excreções e fêmeas PI produzem bezerros PI (DONIS, 1989). Por ser os animais PI a forma de perpetuação do vírus nos rebanhos, calcula-se que mais de 95% das infecções por BVDV tenham origem a partir de vírus de animais PI (HOUE, 1995).

RIBEIRO et al. (2004) verificaram que de uma parcela de fêmeas PI (24%), quando chegam à idade adulta, produzem descendência e atingem a idade de até 75 meses, à medida que esses animais dão origem às famílias de PI, conseqüentemente ocorre à manutenção do BVDV na população, em virtude desses animais imunocompetentes e por isto originam sempre uma descendência PI.

Quando comparados, os níveis de anticorpos de vacas gestantes de fetos PI são descritos como bem maiores do que os encontrados em gestantes de feto não PI. Cogita-se que essa característica se deve ao fato do estímulo constante promovido pelo BVDV persistente no feto; então é possível que altos títulos de anticorpos em vacas prenhes podem ser sugestivos de fetos PI durante o último trimestre de gestação (LINDBERG et al., 2001).

Alguns animais PI podem apresentar-se saudáveis, mas também, existem aqueles animais fracos com crescimento retardado ou com sinais neurológicos que tem

sido frequentemente diagnosticado como PI (BAKER, 1995; DONIS, 1989). Em animais PI, pode ocorrer o desenvolvimento da doença da mucosa, caracterizada por diarreia profusa, às vezes sanguinolenta, e frequentemente seguida por erosões da mucosa digestiva (BROWNLIE, 1985).

A doença das mucosas ocorre principalmente na faixa etária entre 6 meses e 2 anos de idade, sendo oriunda de uma mutação do vírus, original de PI, ou seja, uma estirpe de vírus antigenicamente idêntica, que passou de NCP para CP (BROWNLIE, 1990; MCCLURKIN et al., 1985).

Muitos animais PI, no entanto, não desenvolvem essa mutação e persistem infectados por toda a vida. Sabe-se que a doença das mucosas ocorre apenas em animais que, tendo sido infectados intrauterinamente e nascidos imunotolerantes ao vírus NCP, são posteriormente superinfectados por uma estirpe mutante CP (BROWNLIE, 1990).

A transmissão da infecção dá-se principalmente por contágio direto (focinho com focinho, coito, mucosa com mucosa, intra-uterina; transmissão horizontal pelo leite e pelo colostro) e, contágio indireto focinho com feto abortados ou placenta, focinho com secreções ou excreções, focinhos com alimentos contaminados, aerossóis em ambientes fechados, fômites, vacinas e sêmen contaminados (HOUE, 1995; MEYLING et al., 1979).

A BVDV atinge também outras espécies animais porque além de sorologia positiva encontrada em níveis variáveis em bovinos de corte ou de leite, anticorpos contra o BVDV têm sido ocasionalmente detectados em suínos (ROEHE et al., 1998), javalis (FLORES, 2004)*, ovinos (LOKEN, 1995), caprinos (CASTRO et al., 1996), em

* FLORES E. F. 2004. Comunicação pessoal (Laboratório de Virologia, Depto Med. Vet. Preventiva, CCR, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: flores@ccr.ufsm.br).

rebanhos bubalinos com problemas reprodutivos (PITUCO et al., 1997) e em cervos desalojados do seu habitat entre São Paulo e Mato Grosso do Sul (ALFIERI, 2004).

Alfieri A.A. 2004. Comunicação pessoal (Laboratório de Virologia Animal, Depto Med. Vet. Preventiva, CCA, Universidade Estadual de Londrina. Email: alfieri@uel.br).

O animal imunocompetente, durante o processo da infecção, apresenta o BVDV na maioria dos tecidos, sendo eliminado intermitentemente, durante a fase clínica, e, pode ser isolado de qualquer secreção e excreção, tais como descarga nasal, saliva, sêmen, urina, lágrima e leite (CORIA & MCCLURKIN, 1978; RADOSTITS & LITTLEJOHNS, 1988; MEYLING et al., 1990).

Entretanto o diagnóstico clínico das síndromes causadas pelo BVDV é complicado pela grande diversidade de manifestações clínicas. Mesmo assim, deve-se suspeitar da infecção pelo BVDV sempre que houver perdas embrionárias, abortos, malformações fetais, nascimento de animais fracos, morte perinatal, além de casos de doença entérica ou respiratória com componentes hemorrágicos como melena, petéquias em mucosas e serosas, além de erosões e ulcerações no trato digestivo que também são sugestivos da infecção pelo BVDV (FLORES, 2003).

Para o imunodiagnóstico da BVD vários métodos podem ser aplicados. Entre eles, BROCK (1995) cita o isolamento viral, a virusneutralização, o ensaio imunoenzimático, e a reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR). BARON et al., (1994) referem-se ainda a outras provas sorológicas, como fixação de complemento, imunofluorescência indireta e imunofluorescência anticomplemento.

O teste de Elisa é outro exame que apresenta boa especificidade e sensibilidade, além da facilidade em poder analisar um grande número de amostras (BOLIN, 1995). Biópsias de pele (colhidas na orelha) para a detecção de antígenos virais empregando a imunoperoxidase ou o Elisa tem sido recentemente utilizada na América do Norte para a triagem e detecção de animais PI.

Os anticorpos detectados na virusneutralização são dirigidos à glicoproteína E2, principal antígeno responsável pelas diversidades de determinantes antigênicos do BVDV (GOENS, 2002; BROCK, 2003; SANDVIK, 2005). Em decorrência desse fato, os

resultados dos exames realizados pelos laboratórios apresentam variações justamente porque cada um utiliza uma estirpe diferente para o diagnóstico. Portanto, na sorologia pareada não se deve comparar títulos de anticorpos de um animal em fase aguda da doença com os títulos da fase de convalescência oriundos de testes realizados em laboratórios diferentes (DUBOVI, 1996). Além disso, para melhorar os resultados dos testes deve ser empregado estirpes citopatogênicas de amostras locais do BVDV ou estirpes comuns como as estirpes NADL, Singer pertencentes ao BVDV-1, que devido a sua alta patogenicidade facilitam a leitura do teste (EDWARDS & PATON, 1995; BROCK, 1995; SANDVVIK, 2005).

Grande parte dos laboratórios que realizam os testes de virusneutralização para o BVDV no Brasil utilizam apenas as estirpes do BVDV-1; por isso, existem poucas informações relacionadas à ocorrência do genótipo do BVDV-2 e da imunidade cruzada entre os genótipos nos rebanhos, o que pode resultar em diagnósticos falsos - negativos (DIAS, 2008).

A BVD possui distribuição mundial, sendo na maioria dos países endêmica, com soroprevalência de 60 a 85% e com 1% a 2% de animais PI (HOUE, 1999). No Brasil foi realizado um estudo por RICHTZEINHAIN (1997), usando a virusneutralização, para testar 2.448 amostras sanguíneas de bovinos provenientes de 56 propriedades de diversos Estados e assim pode-se constatar a prevalência de 65% de animais reagentes em Minas Gerais, 84% no Mato Grosso do Sul, 67% no Paraná, 71% no Rio de Janeiro, 73% no Rio Grande do Sul e 78% em São Paulo, sendo que em todas as fazendas havia pelo menos um animal reagente. Em Goiás, numa região estudada de Goiânia em que não se adotava a vacinação, a prevalência encontrada foi de 54,11% (GUIMARÃES et al., 2001).

Nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo, em que amostras de 376 vacas lactantes foram analisadas para verificar a ocorrência da BVD, foram encontrados animais reagentes em todas as propriedades estudadas com ocorrência entre 56% a 57% de bovinos reagentes (SAMARA et al., 2004).

Apesar do avanço científico no conhecimento do BVDV, ainda não existe tratamento específico para a enfermidade. A terapia utilizada contra a infecção aguda é

exclusivamente de suporte por meio de hidratações com soluções hidroeletrólíticas para correção da desidratação, uso de antidiarréicos e protetores gastrointestinais, devido à diarreia. Antibióticos são utilizados para o tratamento de infecções bacterianas secundárias, mas o uso de corticosteróides é contra-indicado, devido ao perigo da potencialização do efeito imunossupressor (BAKER, 1995).

Desde modo, o controle da BVD baseia-se na identificação e remoção dos animais PI do rebanho, associado ou não ao uso de vacinas para proteger os animais suscetíveis (DUBOVI, 1992; BOLIN, 1995; VAN OIRSCHOT et al., 1999). As vacinas devem proteger os animais da doença clínica e principalmente impedir a infecção transplacentária com conseqüente infecção fetal (BOLIN, 1995; VAN OIRSCHOT et al., 1999).

As vacinas com BVDV atenuado ou inativado tem sido utilizadas no controle da infecção na América do Norte e Europa. Mas a grande variabilidade antigênica do vírus e a existência de dois grupos antigênicos distintos, ou sejam, BVDV-1 e BVDV-2 prejudicam a eficácia das vacinas (VAN OIRSCHOT et al., 1999; DUBOVI, 2004).

Contudo, alguns programas de controle e erradicação da infecção pelo BVDV sem o uso de vacinas têm sido implementados em vários países europeus. Esses programas são voluntários e baseiam-se na identificação de rebanhos infectados seguidos do descarte dos animais PI obtendo assim a certificação de rebanhos livres (LINDBERG & ALENIUS 1999). Em rebanhos que possuem animais PI a identificação dos positivos é realizada por resultados da sorologia com altos títulos de anticorpos, já que a presença do vírus induz este tipo de imunidade na maioria dos animais (HOUE, 1995).

Com isto, programas oficiais ou voluntários de controle em grande escala poderiam ser viabilizados tecnicamente e economicamente pela disponibilidade inicial de um teste para triagem e identificação de rebanhos infectados. Mesmo assim, em rebanhos não vacinados contra o BVDV deve-se ficar atento, pois métodos de diagnóstico sorológico tradicionais apenas indicam um contato prévio com o vírus e não podem ser utilizados para o estabelecimento do diagnóstico conclusivo. A soroconversão pós-vacinal em animais imunizados, com vacinas produzidas por

metodologias convencionais, não permite diferenciar os resultados sorológicos positivos ocasionados pela infecção natural daqueles resultantes da vacinação. A presença de animais PI também pode dificultar a eficiência das técnicas sorológicas mascarando resultados positivos (FLORES, 2003).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Pesquisar a ocorrência da infecção pelo BVDV em vacas gestantes, e em seus respectivos fetos, por meio da titulação de anticorpos no teste de virusneutralização contra os genótipos do BVDV a partir de soros sanguíneos colhidos em frigorífico, no interior do Estado de São Paulo.

2.1.2 Objetivos específicos

- Pesquisar pelo imunodiagnóstico ocorrência da infecção em vacas.
- Triar dados epidemiológicos da infecção na região de origem dos animais adultos.
- Determinar a ocorrência dos genótipos BVDV-1 e BVDV-2, nos animais do estudo.
- Procurar alterações anatomo patológicas características do BVDV em fetos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Durante o abate, em um frigorífico inspecionado pelo sistema federal de fiscalização, localizado no interior do Estado de São Paulo, foram colhidas 219 amostras de sangue de vacas gestantes e dos respectivos fetos cuja idade foi estimada, conforme parâmetros definidos por REXROAD et al. (1974) citados por DINIZ et al. (1998), como estando entre 40 a 240 dias de gestação. Os animais eram provenientes da região norte e nordeste do Estado de São Paulo, além de parte do Estado de Minas Gerais (triângulo mineiro). Os rebanhos foram caracterizados na tabela 1.

Aproximadamente 700 animais, predominante machos, eram abatidos por dia, para o abastecimento do mercado interno e para exportação para países como Rússia, China e Grécia.

Tabela 1. Origem dos rebanhos, número de amostras e datas das Respectivas colheitas de material sanguíneo de vacas gestantes e respectivos fetos abatidas em matadouro frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.

Data colheitas	Municípios	nº de amostras
11/04/2008	São João Boa Vista (SP), Vargem Grande do Sul (SP), Patrocínio Paulista (SP) e Prata (MG)	55
25/04/2008	Conchas (SP), Monte Aprazível (SP), Areias (SP), Pompéia (SP)	52
21/05/2008	Tanabi (SP), Paulo de Faria (SP) e Frutal (MG)	51
13/06/2008	Tarabai (SP), Pedra Bela (SP), Joanópolis (SP) e Ribeirão Preto (SP)	61

3.1.2 Colheita de Sangue

As amostras de sangue foram colhidas em quatro oportunidades no período de abril a junho de 2008 de vacas gestantes e respectivos fetos, abatidas no citado matadouro frigorífico. Amostras foram colhidas em tubos de ensaio no momento da sangria pelo corte da jugular (vacas) e por punção intracardíaca (fetos), com o uso de seringa de 10 mL e agulhas 40 G x 12mm. Durante o procedimento do abate, as vacas gestantes foram devidamente numeradas para identificação, de forma a identificar seus respectivos fetos.

As amostras eram mantidas por 3 horas em temperatura ambiente para coagulação e, após esse período foram acondicionadas em caixas térmicas para em seguida serem transportadas ao setor de Viroses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP- Câmpus de Jaboticabal/SP. No laboratório, o sangue foi centrifugado a 1.080xG durante 15 minutos, separando-se duas alíquotas de 1,5 mL de soro em microtubos tipo "eppendorf", que foram identificadas, armazenadas e congeladas até o momento do uso. A separação do soro sanguíneo em duas alíquotas foi para que uma amostra fosse testada contra o genótipo do BVDV-1 e outra para o genótipo do BVDV-2, de modo que todas as amostras tivessem condições idênticas de manipulação antes do teste sorológico, tanto para o genótipo do BVDV-1 quanto para o genótipo do BVDV-2.

3.2 Teste sorológico de Virusneutralização

As amostras foram submetidas ao teste de virusneutralização conforme preconizado pelo “Manual of Diagnostic Test and Vaccinas of Terrestrial Animals (OIE, 2008) para a pesquisa de anticorpos contra os genótipos BVDV-1 e BVDV-2 utilizando as estirpes citopatogênicas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria/RS.

3.2.1 Manutenção das culturas celulares

As células da linhagem Madin & Darby Bovine Kidney (MDBK) foram cultivadas em monocamadas e utilizadas nas reações de virusneutralização, titulação e multiplicação viral. O cultivo foi feito em garrafas de poliestireno descartáveis, marca TPP[®], de 75cm² (T₇₅) ou 150cm² (T₁₅₀) utilizando-se o meio de manutenção “Minimum Essential Médium” (Eagle-MEM) marca Gibco[®] filtrado com o filtro de 22µm Millipore[®], pH 7, sem adição de antibióticos, acrescidos de 0,2% de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino Cultilab[®] (SFB) livre de *Pestivirus* e de anticorpos contra o BVDV.

As culturas celulares foram mantidas a temperatura de 37^o C e, após 72 horas, foram submetidas a subcultivos, ocasião em que o meio de manutenção foi retirado e a monocamada foi submetida à ação da tripsina-versene Difco[®], para o descolamento do tapete celular. Em seguida, as células foram ressuspendidas adicionando o meio de manutenção MEM, sendo uma alíquota retirada para a contagem em câmara de Neubauer. Depois elaborou-se uma suspensão com 300.000 células/mL para ser utilizada na virusneutralização, além de outras com 200.000 células/mL para que fossem realizados novos subcultivos, sempre acrescidos com 10% de SFB.

3.2.2 Multiplicação do vírus padrão

As amostras do BVDV citopatogênico dos genótipos do BVDV-1 (Singer) e do genótipo do BVDV-2 (VS-253) foram inoculadas em células MDBK cultivadas em monocamadas, em garrafas de poliestireno com área de 25cm² (T₂₅).

Foi retirado o meio MEM das garrafas com o tapete celular formado inoculando-se a seguir 1mL do vírus. Enquanto incubada a 37^o C em estufa de CO₂, a garrafa era movimentada lentamente a cada 10 minutos para melhor adsorção do vírus ao tapete celular. Transcorrido o período de uma hora, foram adicionados 5mL do meio de

manutenção suplementado com 5% de SFB. As garrafas foram então incubadas à temperatura de 37° C até que o tapete celular apresentasse efeito citopatogênico (ECP) em uma área de pelo menos 90% da garrafa.

No momento em que observou-se os efeitos citopatogênicos no tapete celular, submeteu-se o inóculo ao congelamento a -20° C, seguido do descongelamento a 37° C para que houvesse o rompimento das células e liberação das partículas virais. As suspensões foram centrifugadas a 4° C por 15 minutos a 5.000 x g para a decantação dos resíduos. O sobrenadante contendo as partículas virais foi alíquotado em 0,7mL em criotubos vedados e armazenados a -196°C em botijão de nitrogênio líquido até o momento de uso. A titulação viral foi feita por meio do descongelamento de uma dessas alíquotas.

3.2.3 Titulação Viral

A titulação viral foi realizada em placas de poliestireno com 96 cavidades de fundo chato TPP[®], foram adicionados 50 µl de meio MEM nas colunas exceto na coluna 9 que permaneceu vazia para que não houvesse a contaminação do controle celular que estava nas três últimas colunas.

Depois do descongelamento de uma das alíquotas do vírus à temperatura de 37° C, misturou-se 0,5 mL da suspensão viral em 4,5 mL de meio MEM em tubos mantidos em banho de gelo para em seguida realizar-se as diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁸.

Terminada essa etapa foram colocados 50 µl das diluições virais em diferentes cavidades, exceto nas colunas destinadas ao controle celular e na coluna vazia. Em seguida, foram adicionados 50 µl da suspensão de células com 300.000 células/mL em todas as cavidades bem como 100 µl de células nos controles celulares.

A placa foi incubada a 37° C em estufa com tensão de 5% de CO₂ e após 96 horas foi feita à leitura do ECP em microscópio invertido. O título viral foi obtido usando-se a metodologia de cálculo preconizado por REED e MUENCH (1938).

3.2.4 Pesquisa dos anticorpos neutralizantes

As amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas ao banho-maria à temperatura de 56° C por 30 minutos para inativação do sistema complemento. A VN foi feita em placas de poliestireno com 96 cavidades onde foi colocado 100µl do meio Eagle-MEM acrescidos de 10% de SFB e 1% de antibiótico composto por penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL) Gibco®, na primeira coluna (controle de célula), 90 µl na segunda coluna (controle de toxicidade da amostra) com 10 µl de soro, diluição 1:10 a mesma da primeira diluição testada.

Na terceira coluna foram colocados 80 µl de meio de manutenção e 20 µl da amostra obtendo diluição inicial de 1:5 do soro; a partir da quarta coluna foi adicionado 50 µl do meio de manutenção; assim a diluição do soro da terceira coluna foi homogeneizado para em seguida serem retirados 50 µl da cavidade que foi passada para a quarta coluna; esse procedimento foi repetido sequencialmente da cavidade anterior para a próxima cavidade, de forma ordenada nas diluições de 1:10 até 1:5120.

A placa foi então incubada por uma hora em estufa com tensão de 5% de CO₂ a 37° C. Decorrido o tempo de incubação foram colocados 50 µl de células MDBK contendo 300.000 células/mL em todas as cavidades. Em seguida foi novamente colocada na estufa e ali permaneceu por 96 horas. Procedeu-se então a leitura em microscópio óptico invertido do ECP característico.

Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram neutralização total de 100 TCID₅₀ do BVDV a partir da diluição 1:10. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição em que foi verificada a neutralização viral, e o título final foi resultante da média geométrica dos títulos encontrados nas duplicatas.

3.2.5 Controle das TCID₅₀

Para que o teste de virusneutralização fosse validado verificou-se se as TCID₅₀ estavam dentro do intervalo de validação do teste preconizado pela OIE (2008), que é de 30 a 300 TCID₅₀ para o BVDV. Ao valor apresentado na titulação viral foi subtraído o logaritmo de 100 TCID₅₀ (2,0) e o resultado foi obtido por meio do antilogaritmo correspondente, cujo volume final da diluição conteria as 100 TCID₅₀.

Essa mesma diluição que definiu as 100 TCID₅₀ foi utilizada na placa de validação. A partir dela foram obtidas as diluições que definiram 1, 10 e 30 TCID₅₀.

Após as diluições de titulação viral terem sido feitas na placa de poliestireno 50 µL foi colocado as diluições 1, 10, 30 e 100 TCID₅₀ nas quatro primeira colunas. A quinta e a décima primeira permaneciam sem nenhum reagente, ou seja, colunas limítrofes, e a última coluna ficou para o controle celular, onde eram adicionados apenas 100 µL de meio de manutenção e 50 µL suspensão de células.

As cinco colunas restantes da placa ficaram para o controle do título viral que estava sendo feito nesse teste, da mesma forma descrita no item 3.2.3., pois a suspensão viral utilizada na reação foi obtida a partir da reação com as diluições 10⁻¹ a 10⁻⁸. Sabendo-se o título viral inicial então, para confirmação era utilizado apenas as diluições com intervalos próximos ao título.

Nas cavidades destinadas as diluições virais foram colocados 50 µL de meio de manutenção Eagle- MEM, 50 µL do vírus nas diluições desejadas por cavidade, com oito repetições. A placa foi então incubada por uma hora e submetida aos mesmos intervalos de tempo que era usado na virusneutralização. Decorrido este tempo foi adicionado 50 µL de suspensão celular contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção Eagle-MEM com 10% de SFB.

A placa do controle de doses foi incubada em estufa com tensão de 5% de CO₂ com atmosfera controlada de 5% a temperatura de 37^o C por 96 horas. Decorrido esse tempo foi realizada a leitura em microscópio óptico invertido antes das demais placas para que os resultados do título viral encontrado validassem ou não o teste de virusneutralização.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo com análise da significância dos resultados foi utilizado o teste exato de Fisher, ZAR (1999) para detectar associações ($p < 0,05$) entre as colheitas e os genótipos.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da sorologia genotípica

Conforme pode ser visto na tabela 2, das 219 amostras de soro sanguíneo provenientes dos animais adultos que foram submetidas ao imunodiagnóstico pelo teste de virusneutralização, 46,12% (101/219) foram reagentes para o genótipo do BVDV-1 e 48,40% (106/219) para o genótipo do BVDV-2. Também observou-se que 6,39% (14/219) das amostras foram reagentes somente para o genótipo do BVDV-2 e não para o genótipo do BVDV-1; 4,10% (9/219) foram reagentes para o genótipo do BVDV-1 e não para o BVDV-2. Por outro lado, 47,49% (104/219) das amostras foram negativas para ambos os genótipos.

Descontando os negativos (104) do total de amostras (219) sobraram os positivos (115). Do total de positivos, já foi apresentado os reagentes exclusivos para o genótipo do BVDV-1 (9 amostras) e para o genótipo do BVDV-2 (14 amostras) restando as (92 amostras) com reação para ambos os genótipos; dessas amostras positivas em 7,76% (17/219) os títulos foram iguais para ambos os genótipos; em 16,89% (37/219) prevaleceu maior título para o genótipo do BVDV-1 e em 17,35% (38/219) o maior título foi para o genótipo do BVDV- 2.

Na tabela 3 encontra-se em detalhes os títulos dos anticorpos nas amostras submetidas ao teste de virusneutralização para o genótipo do BVDV-1. Nas 101 amostras reagentes para esse genótipo houve variações de títulos de anticorpos entre

10 e 640; conforme parâmetros de BRUM et al. (2004), 21,46% (47/101) dos títulos de anticorpos foram menores que 80 e 14,16% (31/219) dos títulos de anticorpos foram iguais ou maiores que 80. Não houve diferença estatística significativa entre os títulos de anticorpos

A tabela 4 mostra os títulos de anticorpos virusneutralizante para o genótipo do BVDV-2. Nas 106 amostras reagentes para esse genótipo, os títulos de anticorpos variaram de 10 a 2560. Separados pelos parâmetros de BRUM et al. (2004), 24,66% (54/219) dos títulos de anticorpos foram maiores que 80 e 14,61% (32/106) dos títulos de anticorpos foram iguais ou maiores que 80. Desse modo, não houve diferença significativa entre os títulos dos anticorpos.

Observa-se na tabela 5 que, nas 92 amostras reagentes para ambos os genótipos, houve variações de títulos de anticorpos entre 10 e 640 para o genótipo BVDV-1 e de 10 a 2560 para o genótipo do BVDV- 2. Também analisados sobre a fórmula de BRUM et al. (2004), 18,26% (40/219) dos títulos de anticorpos foram menores que 80 e 21,46% (47/219) foram iguais ou maiores que 80, também neste caso, não houve diferença estatística para os títulos de anticorpos.

4.2 Análise da sorologia fetal

Antes de colher o sangue dos 219 fetos teve-se o cuidado na linha de inspeção do frigorífico, em observar-se possíveis anomalias no fruto da gestação. Uma vez no laboratório as amostras de soro foram analisadas por virusneutralização, mas nenhum soro foi reagente ao genótipo do BVDV-1 ou ao genótipo do BVDV-2, independente de ser o feto proveniente de animais reagentes ou não e independente do período gestacional. Pelo exame anatomopatológico não foi observado morte ou alterações fetais e dos seus anexos, ou seja, todos esses materiais tinham aparência que denotavam normalidade.

Tabela 2. Detecção de anticorpos virusneutralizantes para os genótipos do BVDV-1 e do BVDV-2 em soro de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.

		BVDV-1		
		Reagentes	Não Reagentes	Total
BVDV-2	Reagentes	92	14	106
	Não reagentes	09	104	113
	Total	101	118	219

Tabela 3. Título dos anticorpos virusneutralizante para os genótipos do BVDV-1 em soro positivo de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.

Títulos de anticorpos	números de vacas reagentes ao BVDV-1	% de vacas reagentes ao BVDV-1
Animais não-reagentes	118	53,88%
10	7	3,19 %
14	16	7,31 %
20	8	3,65 %
28	9	4,11 %
40	16	7,31 %
57	6	2,74 %
60	8	3,65 %
Subtotal	70	31,96%
80	6	2,74 %
113	6	2,74 %
160	5	2,28 %
226	3	1,37 %
320	4	1,83 %
453	4	1,83 %
640	3	1,37 %
Subtotal	31	14,16%
Total positivos	101	46,11%
Total examinados	219	100%

Tabela 4. Título dos anticorpos virusneutralizantes para os genótipos do BVDV-2 em soro positivo de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.

Títulos de anticorpos	Números de vacas reagentes ao BVDV-2	% de vacas reagentes ao BVDV-2
Animais não-reagentes	113	51,60%
10	10	4,57 %
14	10	4,57 %
20	23	10,50%
28	11	5,02 %
40	12	5,48 %
57	7	3,20%
60	1	0,46%
Subtotal	74	33,79%
80	10	4,57 %
113	5	2,28 %
160	2	0,91 %
226	1	0,46 %
320	4	1,83%
453	2	0,91 %
640	2	0,91 %
1280	2	0,91 %
1810	2	0,91 %
2560	2	0,91 %
Subtotal	32	14,61 %
Total positivos	106	48,40 %
Total de examinados	219	100%

Tabela 5. Títulos dos anticorpos virusneutralizantes para ambos os genótipos BVDV-1 e BVDV-2 em soro positivos de vacas gestantes abatidas em frigorífico do Estado de São Paulo, durante o período de abril a junho de 2008.

Títulos de anticorpos	Número de vacas reagentes ao BVDV-1	% de vacas reagentes	Número de vacas reagentes ao BVDV-2	% de vacas reagentes
Animais não-reagentes	127	58,00%	127	58,00%
10	8	3,65 %	6	2,74 %
14	13	5,94 %	8	3,65 %
20	5	2,28 %	19	8,68 %
28	7	3,20 %	11	5,02 %
40	15	6,85%	10	4,57 %
57	5	2,28 %	6	2,74 %
60	8	3,65 %	1	0,46% %
Subtotal*	61	27,85%	61	27,85%
80	6	2,74 %	9	4,11 %
113	6	2,74 %	5	2,28 %
160	5	2,28 %	2	0,91 %
226	3	1,37 %	1	0,46 %
320	4	1,83 %	4	1,83 %
453	4	1,83 %	2	0,91 %
640	3	1,37 %	2	0,91 %
1280	-	-	2	0,91 %
1810	-	-	2	0,91 %
2560	-	-	2	0,91 %
Subtotal*	31	14,16%	31	14,16%
Total positivos	92	42,00%	92	42,00%
Total examinados	219	100%	219	100%

* não foi significativo

4.3 Análise da distribuição geográfica

A organização dos resultados dos testes que caracterizaram os genótipos do BVDV-1 e, ou genótipo do BVDV-2, estão apresentados na tabela 6 conforme o período de colheita e a origem dos animais testados.

Quando estes resultados foram analisados, pelo teste exato de Fisher, verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos genótipos do BVDV-1 e do BVDV-2 conforme a data da colheita pois as positivities da primeira colheita foram superiores a segunda, a terceira e a quarta colheita e exibiram diferença significativa ($p < 0,05$) tanto para o genótipo do BVDV-1 quanto para o genótipo do BVDV-2. Já quando comparadas entre si, as outras colheitas não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Na primeira colheita das vacas provenientes dos municípios de São João Boa Vista (SP), Vargem Grande do Sul (SP), Patrocínio Paulista (SP) e Prata (MG), observou-se que no exame de 55 soros pela virusneutralização, 61,81% (34/55) reagiram contra o genótipo do BVDV-1, o mesmo não ocorreu com 38,18% (21/55) que foram negativas; Por outro lado, 69,09% (38/55) reagiram positivamente contra o genótipo do BVDV-2 enquanto 30,90% (17/55) das mesmas não reagiram (figura 1).

Na segunda colheita composta por 52 soros de vacas provenientes dos municípios de Conchas (SP), Monte Aprazível (SP), Areias (SP) e Pompéia (SP), observou-se que pela virusneutralização, 46,15% (24/52) reagiram contra o genótipo do BVDV-1 e 53,84% (28/52) foram negativas enquanto 48,07% (25/52) reagiram contra o genótipo do BVDV-2 mas 51,92% (27/52) das amostras não reagiram contra este genótipo (figura 2).

Nos 51 soros da terceira colheita, composta por vacas provenientes dos municípios de Tanabi (SP), Paulo de Faria (SP) e Frutal (MG) observou-se que, pela virusneutralização, 37,25% (19/51) reagiram contra o genótipo do BVDV-1 e 62,74% (32/51) foram negativas enquanto 39,21% (20/51) reagiram contra o genótipo do BVDV-2 e em 60,78% (31/51) das amostras foram negativas para este genótipo (figura 3).

Na quarta colheita composta por 61 soros de vacas provenientes dos municípios de Tarabai (SP), Pedra Bela (SP), Joanópolis (SP) e Ribeirão Preto (SP) observou-se 39,34% (24/61) soros reagentes contra o genótipo do BVDV-1 e 60,65% (37/61) não reagentes. Por outro lado, 37,70% (23/61) reagiram contra o genótipo do BVDV-2 mas em 62,29% (38/61) das amostras não detectamos soros reagentes contra este genótipo (figura 4).

Tabela 6. Animais positivos sobre os testados, de acordo com as colheitas, no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV- 1 e BVDV-2 realizado após abate em frigorífico do Estado de São Paulo durante o período de abril a junho de 2008.

Data colheitas	Município	BVDV-1 <u>Positivos</u> % nº de amostras	BVDV-2 <u>Positivos</u> % nº de amostras
11/04/2008 1º colheita	São João Boa Vista (SP), Vargem Grande do Sul (SP), Patrocínio Paulista (SP) e Prata (MG)	<u>34</u> (61,81%)* 55	<u>38</u> (69,09%)* 55
25/04/2008 2º colheita	Conchas (SP), Monte Aprazível (SP), Areias (SP), Pompéia (SP)	<u>24</u> (46,15%) ^{NS} 52	<u>25</u> (48,07%) ^{NS} 52
21/05/2008 3º colheita	Tanabi(SP), Paulo de Faria (SP) e Frutal (MG)	<u>19</u> (37,25%) ^{NS} 51	<u>20</u> (39,21%) ^{NS} 51
13/06/2008 4º colheita	Tarabai (SP), Pedra Bela (SP), Joanópolis (SP) e Ribeirão Preto (SP)	<u>24</u> (39,34%) ^{NS} 61	<u>23</u> (37,70%) ^{NS} 61
Total		<u>101</u> (46,11%) 219	<u>106</u> (48,40%) 219

% reagentes = porcentagem calculada para os valores das linhas.

* estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no teste de Fisher.

NS não significativa no teste de Fisher.

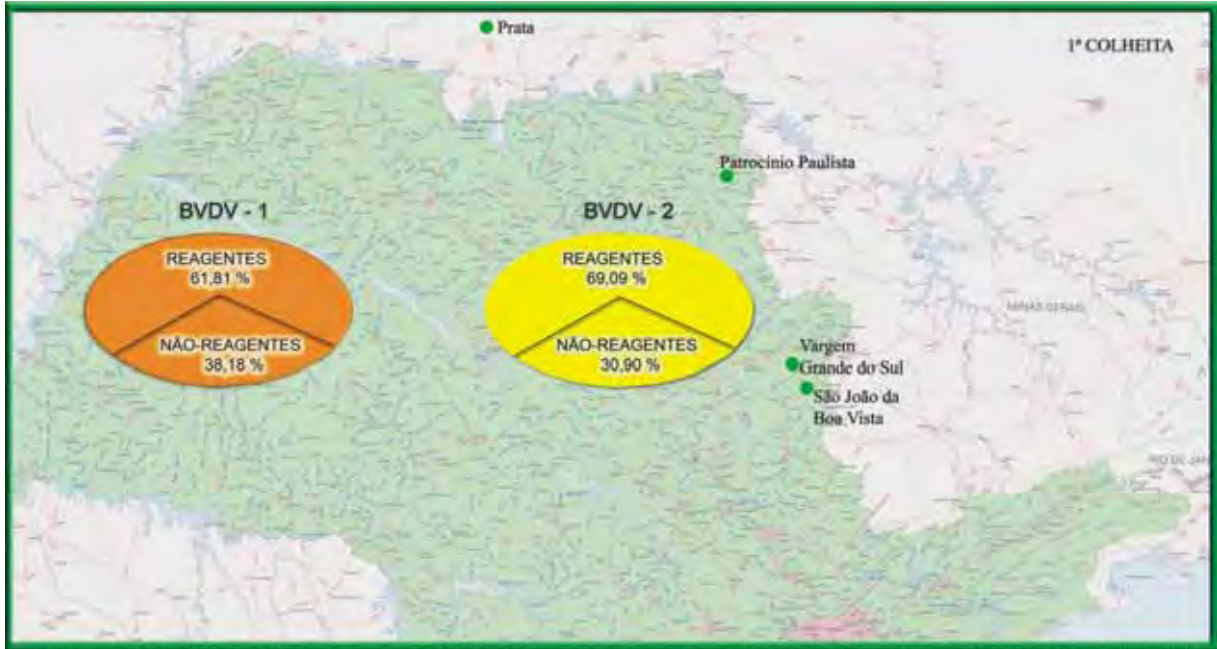


Fig. 1 Origem dos rebanhos da primeira colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV-1 e do genótipo do BVDV-2, realizado após o abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 11 de abril de 2008.

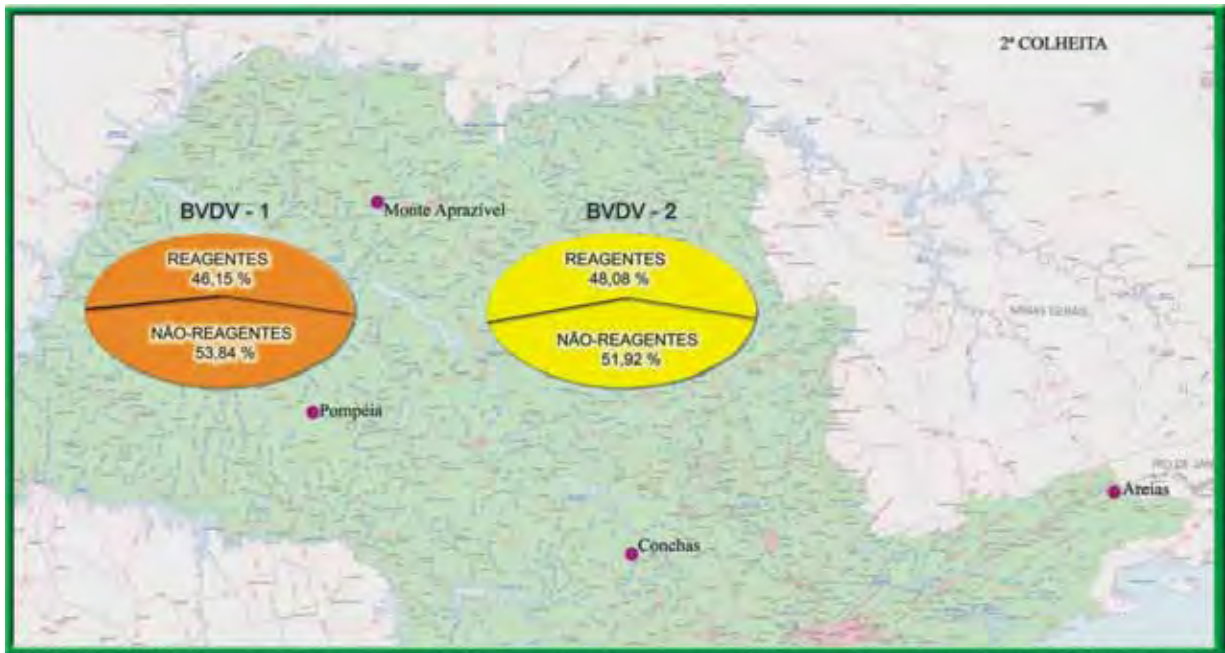


Fig. 2 Origem dos rebanhos da segunda colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV-1 e do genótipo do BVDV-2, realizado após o abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 25 de abril de 2008.

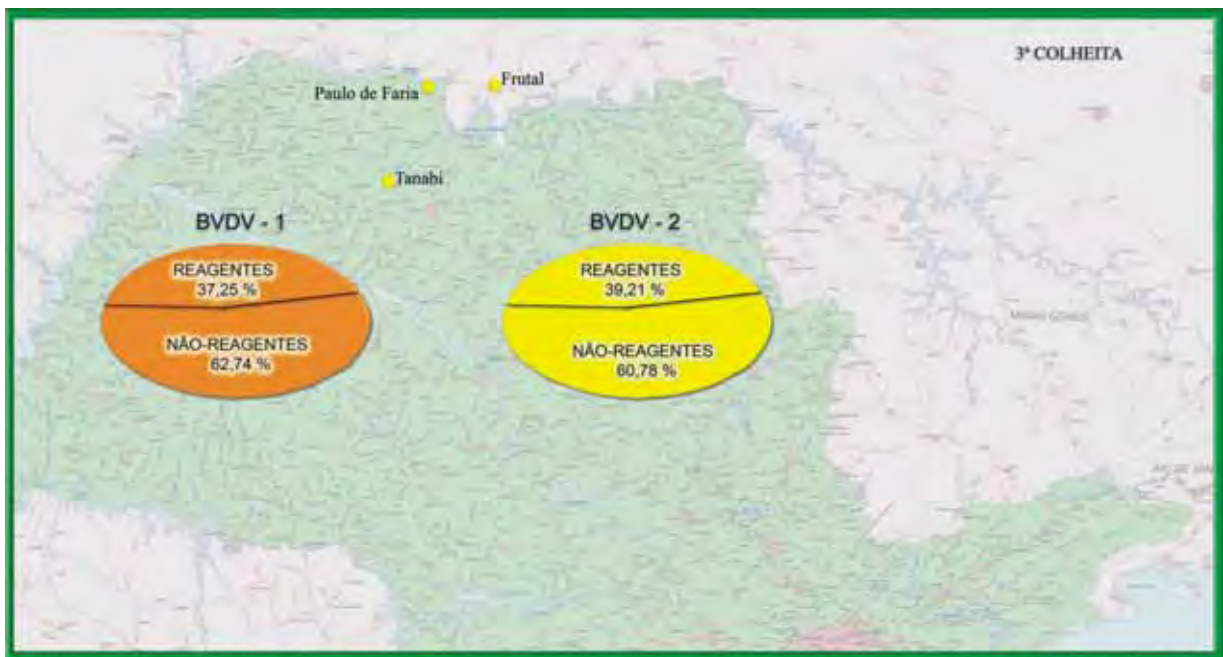


Fig. 3 Origem dos rebanhos da terceira colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virsneutralização para os genótipos do BVDV-1 e do genótipo do BVDV-2, realizado após o abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 21 de maio de 2008.

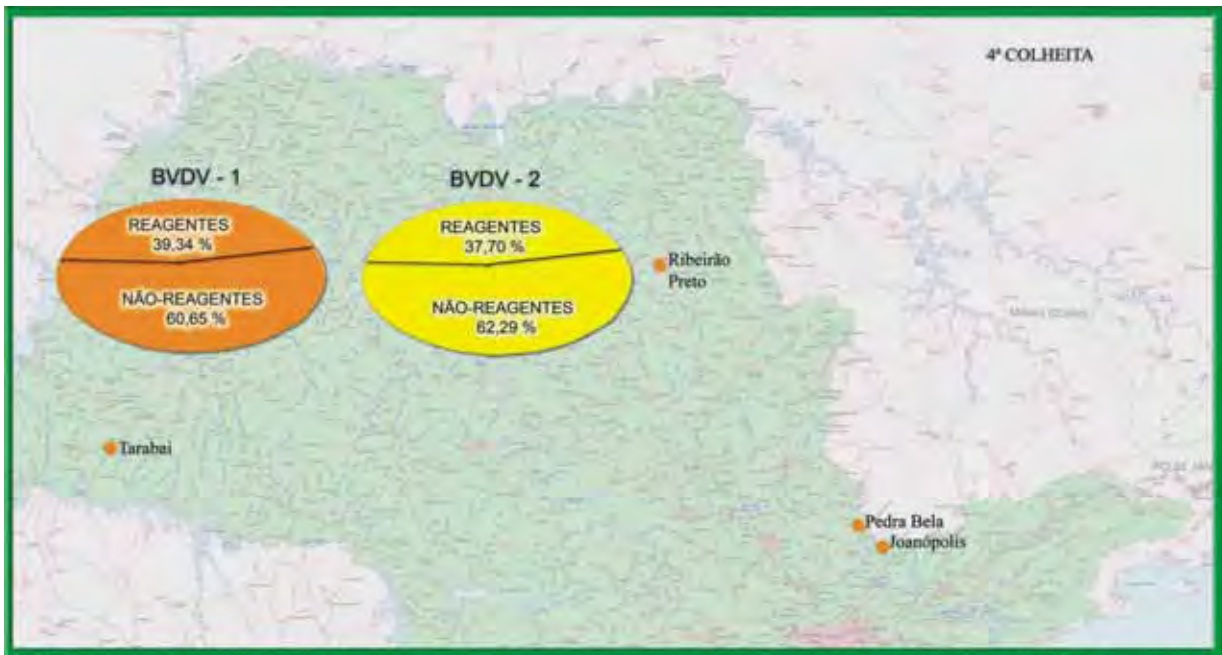


Fig. 4 Origem dos rebanhos da quarta colheita e porcentagem dos animais reagentes e não reagentes no teste de virusneutralização para os genótipos do BVDV-1 e do genótipo do BVDV-2, realizado após o abate em frigorífico do Estado de São Paulo, em 13 de junho de 2008.

5. Discussão

Segundo BRASIL (2008) desde 2004 o Brasil é o líder mundial no cenário da bovinocultura por ser o maior exportador de carne e possuir o segundo maior rebanho do mundo, estimado em aproximadamente 200 milhões de cabeças. A carne brasileira é exportada para mais de 150 países e gera aproximadamente US\$ 4,4 bilhões em receitas para nossa economia. Esse sucesso se deve aos altos investimentos produtivos e ao enorme esforço no âmbito sanitário, impulsionados pelo fortalecimento da demanda mundial.

Apesar de todos esses fatores positivos, a condição sanitária ainda deixa a desejar em decorrência da necessidade de uma ampliação no conhecimento sobre as doenças, principalmente no contexto do conhecimento clínico e anatomopatológico para direcionar o imunodiagnóstico, que torna o controle e a prevenção tecnicamente mais eficazes.

Por isso, o presente trabalho investigou o BVDV, que por ser considerado um dos patógenos mais importantes dos bovinos, causa grandes prejuízos econômicos na pecuária de todo o mundo, além de determinar diversas manifestações clínicas, principalmente relacionadas à esfera reprodutiva.

Para tanto, 219 soros sanguíneos de vacas gestantes e dos respectivos fetos foram submetidos a análise pela vírusneutralização com técnica metodológica, preconizada pela OIE, para detectar a ocorrência da BVDV nas mães e, ou fetos, e suas consequências clínicas epidemiológicas.

A frequência de anticorpos anti-BVDV encontrada nos soros das fêmeas, analisadas provenientes de diversas regiões mostrou que existe uma disseminação da doença em mais da metade dos animais examinados. Este índice desperta uma preocupação epidemiológica principalmente pela possível presença de animais PI nesses rebanhos. Tanto que os dados obtidos se mostram próximos aos 57,18 % em que DIAS et al. (2003) encontraram na região sul do Estado de Minas Gerais e nordeste

do Estado de São Paulo e aos 52,17% de GUIMARÃES et al. (2001) no Estado de Goiás, na região do entorno de Goiânia. No entanto, são inferiores aos achados de QUINCOZES et al. (2007) que detectaram 66,32% da infecção em animais em regiões do Rio Grande do Sul, e aos de FIGUEIREDO et al. (1997) que detectaram soropositividade entre 61,47% e 75,13% em 287 soros de bovinos de diversas regiões de Minas Gerais, colhidos em matadouro. Por outro lado são superiores aos achados na pesquisa realizada por DIAS (2008) em animais de rebanho do Estado de São Paulo e Minas Gerais na qual foi demonstrada a prevalência de 39,2% (102/260). Nossos dados são também superiores aos de LANGONI et al. (1995) que foram de 39,5% no Estado de São Paulo e também relatados por PELLEGRIN et al. (1996), em propriedades do Pantanal onde verificaram positividade em 43,6% das amostras. Na pesquisa de RICHTZEINHAIN (1997) por meio da virusneutralização foi encontrada a prevalência de 65% no Estado de Minas Gerais e 78% no estado São Paulo, sendo que em todas as propriedades havia pelo menos um animal soropositivo.

Mas todos estes trabalhos são passíveis de um problema no diagnóstico. Tudo isso porque a diversidade antigênica do BVDV, em especial a baixa reatividade sorológica cruzada entre os genótipos do BVDV-1 e do genótipo do BVDV-2, pode interferir na pesquisa sorológica (EDWARDS & PATON, 1995, BROCK, 1995). Particularmente, os testes de neutralização viral têm alteração da especificidade na diversidade antigênica do BVDV. Tanto assim que, esse fato foi observado no presente estudo, pois houve variações relativamente grandes de títulos de anticorpos de uma mesma amostra quando utilizadas estirpes diferentes.

Em relação aos animais reagentes para o genótipo do BVDV-1, a pesquisa em apreço encontrou 46,11% (101/219), índice maior do que os 33,8% (88/260) determinados por DIAS (2008) no Estado de São Paulo e Minas Gerais, e acima dos 18,2% encontrado por RUSH et al. (2001) nos Estados Unidos.

Em relação aos animais reagentes para o genótipo do BVDV-2 o trabalho encontrou 48,40% (106/219), índices maiores em relação aos de DIAS (2008) que foram de 36,5% (95/260) e próximos aos 50% encontrados nos Estados Unidos por RUSH et al. (2001). A maior resposta para o genótipo do BVDV-2 foi encontrada em

estudos feitos na Alemanha onde esse genótipo é considerado um tipo de variante emergente (WOLFMEYER et al.;TAJIMA et al.; 2001).

Tendo em vista que a maioria dos laboratórios utilizam somente o genótipo do BVDV-1 nos exames de imunodiagnóstico, ficou então evidente que provavelmente está ocorrendo laudos falsos-negativos porque, nos resultados da presente pesquisa, apareceram 6,39% de amostras positivas(14/219) somente para o genótipo do BVDV-2.

Só esse fato mostra que resultados obtidos de provas laboratoriais, principalmente a virusneutralização, utilizando apenas uma estirpe viral do BVDV, em regiões onde circulam mais de um genótipo, certamente falhariam em detectar um número expressivo de animais positivos, como já foi alertado por FLORES et al., (2000). Por isto, ou se deve incluir os dois genótipos no imunodiagnóstico, ou então é necessário que seja utilizada a estirpe de acordo com um levantamento sorológico anterior na região. Ainda segundo esses mesmos autores, no aspecto epidemiológico há o costume de utilizar no nosso meio vacinas contendo amostras representativas de ambos os genótipos, visando maior proteção. Esse costume no entanto aumenta a reatividade sorológica, levando conseqüentemente a outro problema relacionado à interpretação do imunodiagnóstico (DUBOVI 1992; BOLIN, 1995; VAN OIRSCHOT et al., 1999).

Na pesquisa aplicada aos fetos, não foi detectada a presença de anticorpos contra ambos os genótipos do BVDV, assim como nos resultados de NOGUEIRA (2003). Resultado diferente foi de BOTTON et al., (1998) que detectaram anticorpos neutralizantes em 1,36% (19/1396) das amostras dos fetos colhidos em frigorífico, de PINTO et al (1993) na Argentina onde relataram à ocorrência de 2,03% de anticorpos anti-BVDV em fetos. Na Suíça foram identificados 0,64% (22/3440) de animais PI, conforme citado por RIBEIRO et al. (2004) e CAMARGO (2007) relatou a presença de 1,35% de anticorpos, detectados pelo método ELISA em (7/518) amostras de fetos de vacas provenientes da região de Presidente Prudente.

Nos estudos, que foram feitos apenas para a detecção do vírus da BVDV em amostras de sangue de fetos, foram encontrados por OLIVEIRA (1996), 1,2% (12/1240) de positividade, por BOTTON et al., (1998) 0,79% (11/1396) e por CAMARGO (2007)

2,5% (13/518).

Por fim, nas análises fetais, realizadas não foram constatadas má formação congênita, que sinalizasse a infecção fetal como, por exemplo, hipoplasia cerebelar, microencefalopatia, hidrocefalia, hipotricose, alopecia ou hipoplasia pulmonar, patologias que segundo BIELEFELDT-OHMANN, (1995); GROOMS (2004) estão associadas à infecção pelo BVDV.

Entretanto, considerando a literatura consultada, e as normas interpretativas da OIE (2008) que considera títulos acima de 10 como positivos, pode-se supor então que a positividade vale para ambos os genótipos quando o título interpretativo é atingido, independente de ser maior ou menor conforme o antígeno.

Pelo exposto então, achou-se plausível fazer uma análise dos parâmetros da reatividade regional, determinados nos teste de virusneutralização independente de cada genótipo, como etiologia distinta.

Então, nota-se que a positividade do BVDV no Estado de São Paulo e parte de Minas Gerais (triângulo mineiro) tiveram comportamento distinto. Com isto, apesar da origem diferentes dos animais, só na quarta colheita houve mais positivos para o genótipo do BVDV-1, enquanto que em todas as outras, a predominância da positividade foi para o genótipo do BVDV-2.

O genótipo BVDV-1 e o genótipo BVDV-2 estão com maiores índices (61,81% e 69,09%) respectivamente na primeira colheita de animais provenientes dos municípios de São João Boa Vista (SP), Vargem Grande do Sul (SP), e Prata (MG) como mostra a figura 1; moderados (46,15% e 48,07%) respectivamente na segunda colheita de animais provenientes dos municípios de Conchas (SP), Monte Aprazível (SP), Areias (SP), Pompéia (SP) como mostra a figura 2 e com menores índices (37,25% e 39,21%) respectivamente na terceira colheita composta de animais provenientes dos municípios de Tanabi (SP), Paulo de Faria (SP) e Frutal (MG), como mostra a figura 3 e (39,34% e 37,70%) respectivamente na quarta colheita com animais provenientes dos municípios de Tarabai (SP), Pedra Bela (SP), Joanópolis (SP) e Ribeirão Preto (SP), como mostra a figura 4.

Estes achados comprovam a importância epidemiológica do estudo separado

dos genótipos, fato já enfatizado por outros pesquisadores (FLORES et al., 2000, RUSH et al., 2001 e NOGUEIRA, 2003).

6. CONCLUSÃO

Baseado nos dados da presente pesquisa de anticorpos virusneutralizantes em vacas e respectivos fetos, provenientes de diversos municípios localizados no Estado de São Paulo e parte de Minas Gerais (Triângulo Mineiro), que foram abatidos em frigorífico no interior do Estado de São Paulo verificou-se que:

- a utilização do genótipo do BVDV-1 e do genótipo do BVDV-2 no teste de virusneutralização resultou na detecção de variações que justifica a necessidade do uso de ambos os antígenos para concluir o imunodiagnóstico;
- quando utilizado apenas um genótipo do BVDV no teste de virusneutralização podem ocorrer resultados falsos - negativos no imunodiagnóstico definitivo;
- como a vacinação não é habitual no rebanho nacional, então são fortes os indícios de que o BVDV está disseminado em mais da metade dos rebanhos comerciais das regiões analisadas;
- os animais mais afetados com o genótipo do BVDV-1 se encontram nas regiões dos municípios de Tarabi (SP), Pedra Bela (SP), Joanópolis (SP), e Ribeirão Preto (SP).
- as regiões mais afetadas para o genótipo do BVDV-2 se encontram nos municípios de São João da Boa Vista (SP), Patrocínio Paulista (SP), Prata (MG), Vargem Grande do Sul (SP), Conchas (SP), Monte Aprazível (SP), Areias (SP), Pompéia (SP), Tanabi (SP), Frutal (MG),

Paulo de Faria (SP);

- nenhum feto apresentou anticorpos ou alterações morfológicas, mesmo estando já desenvolvidos e podendo ser considerados imunocompetentes, independente de ser filho de mãe reagente.

7. REFERÊNCIAS: *

BAKER, J. C. The clinical manifestations of Bovine Viral Diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North América: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 9 th. ed. St. Louis: Mosby, p. 958 1994.

BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection: a window on the pathogenesis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, p. 447-445, 1995.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, F.J. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Athens, v.10, p. 135–139, 1998.

BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 615-625, 1995.

BOLIN S. R. The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. **Veterinary Medicine**, Prague, v. 85, n. 10, p. 1123-1132, 1990.

* De acordo com as Normas Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Jaboticabal 2008 (<http://www.fcav.unesp.br/medveterinaria/normasdiretrizes.php>)

BOTTON, S. A.; SILVA, A. M. da; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Antigenic characterization of brazilian bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates by monoclonal antibodies and cross neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 1429-1438, 1998.

BRASIL. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Principais produtos do agronegócio brasileiro / Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio.** Disponível em (http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/princ_agro_brasileiro_web.pdf). Acesso em: 14 dez. 2008.

BROCK, K. V. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. In: BAKER, J. C., HOUE, H. Bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 549-562, 1985.

BROCK, K. V. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 133-135, 2003.

BROWNLIE J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, p. 371-379, 1990.

BROWNLIE J.; CLARKE M.C.; HOOPER L. B.; BELL G. D. Protection of bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. **Veterinary Record**, London, v. 137, no 3, p. 58-62, 1995.

BROWNLIE J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Rev. Sci. Tech.**, OIE, n. 9, p. 43-59, 1990.

BRUMM L. P. B.; FLORES E. F. WEIBLEN R.; SCHERER C.F.C.S.; KREUTZ L.C. DÜRR J.W.; QUADROS V.L. MAZZUTTI, K.A. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em amostras de tanque de leite de rebanho leiteiros do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, Niterói, n. 11, p. 84-87, 2004.

CARMAN S., DREUMEL T.; VAN RIDPATH, J. F.; HAZLETT M.; ALVES D.; DUBOVI E. J.; TREMBLAY R.; BOLIN S.R.; GODKIN A.; ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. **Journal Veterinary of Diagnostic Investigation**, Davis, v. 10, n.1, p. 27-38, 1998.

CAMARGO, C. N. **Infecção transplacentária pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD) em fetos bovinos oriundos de abatedouro da região de Presidente Prudente**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CASTRO, R. S.; SILVA, F. A. G.; FRUTUOSO, E. M.; NASCIMENTO, S. A. Anticorpos contra pestívirus e herpesvírus no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23.,1996, Olinda. 1996. **Anais...** p.252.

CHASE, C.C.L.; CHASE, S. K.; FAWCETT, L. Trends in the BVDV serological response in the Upper Midwest. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 145-151, 2003.

CHILDS, T. Disease of cattle: Saskatchewan. **Canadian Journal Comparative Medicine**, Quebec, v. 10, p. 316-319, 1946.

CORIA, M. F. McCLURKIN, A. W. Specific immune tolerance in a apparently healthy bull persistently infected with BVD virus. **Journal American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 172, p. 449-451, 1978.

DIAS, F. C. **Diarréia Viral Bovina (Bvd): Aspectos Epidemiológicos da Infecção Persistente, Avaliação Sorológica da Resposta Imune e Caracterização Molecular do Vírus**. 2008. 157f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva- Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, p.161-168, 2003.

DINIZ, E. G.; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R. C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.1, p.70-76, 1998.

DONIS R. Bovine viral diarrhea: the unraveling of a complex of clinical presentations. **Bovine Proceedings**, v. 20, p. 16-22, 1989.

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

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

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Medicine**, v.91, p.867-872, 1996.

EDWARDS, S.;PATON, D. Antigenic differences among pestiviruses. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n.3, p. 563-577, 1995.

FIGUEIREDO, H.C.P.; VIEIRA, P.R.; LAGE, A.P.; LEITE, R.C. Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia bovina a vírus em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.4, p.11-15, 1997.

FLORES, E.F. Vírus da Diarreia Viral Bovina. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n.1-2, p. 3-9, 2003.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. GIL, L. H. V. G.; TOBIAS, F. L.; LIMA, M.; GARCEZ,D.C.; BOTTON, S. A. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n.1, p. 7-11, 2000.

FLORES, E. F.; GIL , L. H. G. V.; BOTTON, S. A.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J. F.; KREUTZ, L. C.; PILATI, C.; DRIEMEIER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A. C. clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Virus Research**, Oxford, v. 4, suppl. 1, p. 55, 1999.

GILLESPIE, J. H.; BAKER J. A.; McENTEE, K. A. A cytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea virus. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 50, p.73-79, 1960.

GOENS, S. D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 43, n. 12, p. 946-954, 2002.

GUIMARÃES, P. L. S. N.; CHAVES, N.S.T.; SILVA, L. A. F.; ACYPRESTE, C. S. Freqüência de Anticorpos Contra o Vírus da Diarreia Viral Bovina em Bovinos, em Regime de Criação Semi-Extensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 35-40, 2001.

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

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

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

HORZINEK, M. C. Pestivirus-taxonomic perspectives. ***Archives Virology***, Vienna, suppl.3, p. 1-5, 1991.

LANGONI, H.; PAES, A. C.; TONIN, F. B.; SILVA, A. V.; DENARDI, M. B. Prevalence of BVD, IBR and PI3 in bovine by ELISA test. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1995, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Virologia, 1995.

LINDBERG A.; ALENIUS S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. ***Veterinary Microbiology***, Amsterdam, v. 64, v. 2-3, p. 197-222, 1999.

LINDBERG A.; GROENENDAAL, H.; ALENIUS S.; EMANUELSON, U. Validation of a test for dams carrying fetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus base on determination of antibody levels in late pregnancy. ***Preventive Veterinary Medicine***, Amsterdam, v. 51, n.3-4, p. 199-211, 2001.

LOKEN, T. Border disease in sheep. ***Veterinary Clinics of North America***, Philadelphia, v.11, p.579- 595, 1995.

MEYLING, A.; HOUSE, H.; JENSEN, A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhea virus. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 9, n. 1, p. 75-93, 1990.

MOENNIG V.; LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 477-487, 1995.

McCLURKIN, A. W.; LITTLEDIKE, E. T.; CUTLIP, R. C.; FRANK, G. H.; CORIA M. F.; BOLIN, S. R. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. **Canadian Journal of Comparative Medicina**, Ottawa, v. 48, p. 156-161, 1985.

NOGUEIRA, F. S. **Diagnóstico da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em propriedades da microrregião de Viçosa**. 2003. 51f. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

OIE. Office International des Épizooties. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Disponível em: (http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00132.htm). Acesso em: 14 jun. 2008.

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

OLIVEIRA, L.G.; OLIVEIRA, E.A.S; SILVA, L.H.T. Presença de pestivirus e anticorpos contra pestivirus em soros e cultivos celulares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.48, p.513-521, 1996.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J. Identification of a new pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, Duluth, v. 203, p.260-267, 1994.

PINTO, G. B.; HAWKES, P. ; ZABAL, O.; ULLOA, E.; LAGER, I. A.; WEBER E. L.; SCHUDEL, A. A. Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina. n. 55, v.3, p. 385-388, 1993.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C.; OKUDA, L. H. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia bovina a vírus (BVD) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico em São Paulo**, São Paulo, v. 64, n.1, p. 23-28, 1997.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral 154 bovina na região sul do Rio Grande do Sul. **Semina**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

.RADOSTITS, O. M.; LITTLEJOHNS, I. R. New concepts in the pathogenesis diagnosis and control of disease caused by the bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Journal**, v. 29, p. 513-528, 1988.

RAMSEY, F. K.; CHIVERS, W. H. Mucosal disease of cattle. **North American Veterinarian**, Santa Barbara, CA, v. 34, p. 629-633, 1956.

REED, R. H.; MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 27, p. 493-497, 1938.

REXROAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W.J. Crow-rumpf length of fetuses in

purebred Holstein-friesian cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 57, n. 3, p. 346-347, 1974.

RICHTZENHAIN, L. J. Em busca de respostas. **Revista dos Criadores**, São Paulo, n. 808, p. 40, 1997.

RIDPATH, J.; BOLIN, S.; DUBOVI, E. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, Duluth, v. 205 p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J. F.; NEIL, J. D.; FREY, M.; LANDGRAF, J. G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1-2, p. 145-155, 2000.

ROEHE, P. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; MUÑOZ, J. C. P. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no País. In: Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), 1998, Santa Maria, RS: **Anais...** Santa Maria: Laboratório de Virologia, 1998. p.30-48.

RUSH, D. M., THURMOND, M. C., MUNOZ-ZANZI, C. A HIETALA, S.K. Descriptive epidemiology of post-natal bovine viral diarrhoea virus infection in intensively managed dairy heifers. **Journal American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 219, n.10, p.1426-1431, 2001.

SANDVIK, T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 3-16, 2005.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G. Ocorrência de diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, p. 396-403, 2004.

TAJIMA, M.; FREY, H. R.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; MOENNIG, V.; SCHOLZ, H.; GREISER-WILKE, I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. **Virus Research**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 31-42, 2001.

VAN OIRSCHOT, J. T., BRUSCHKE, C. J. M.; Van RINJ, P. A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n.2-3, p.169-183, 1999.

VAN RIJN, P. A.; VAN, GENNIP H. G. P.; LEENDERTSE, C. H.; BRUSCKE, C. J. M.; PATON, D. J.; MOORMANN, R. J.; OIRSCHOT, J. T. van. Subdivision of the Pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. **Virology**, Duluth, v. 237, n. 2, p. 337-348,1997.

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, p. 51-58, 1974.

VILCEK, S.; NETTLETON, P. F.; HERRING, J. A.;HERRING, A. J. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.42, p.53-64, 1994.

WOLFMEYER, A., WOLF G.; BEER M. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. **Archives Virology**, Vienna, v. 142, p. 2049-2057, 1997.