

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

VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA
BOVINA PELA ASSOCIAÇÃO COM A DIARRÉIA VIRAL BOVINA
E A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

Bruna Alexandrino
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

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

VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA RINOTRAQUEÍTE INFECIOSA
BOVINA PELA ASSOCIAÇÃO COM A DIARRÉIA VIRAL BOVINA E
A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

Bruna Alexandrino

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 – 2008

A381v Bruna, Alexandrino
Variação da ocorrência da rinotraqueíte infecciosa bovina pela
associação com a diarreia viral bovina e leucose enzoótica bovina./
Bruna Alexandrino – Jaboticabal, 2008
vii, 59 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Samir Issa Samara
Banca examinadora: Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro, Prof.
Dr. Fumio Honma Ito
Bibliografia

1. Rinotraqueíte infecciosa bovina. 2. Diarreia viral bovina. 3.
Leucose enzoótica bovina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.2

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA PELA ASSOCIAÇÃO COM A DIARRÉIA VIRAL BOVINA E A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

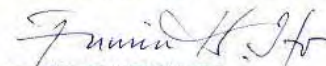
AUTORA: BRUNA ALEXANDRINO

ORIENTADOR: Dr. SAMIR ISSA SAMARA

Aprovado 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


Dra. MARIA DA GLÓRIA BUZINARO


Dr. FUMIO HONMA ITO

Data da realização: 26 de fevereiro de 2008.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. SAMIR ISSA SAMARA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNA ALEXANDRINO – nascida em 5 de março de 1980, no município de São Carlos – SP, filha de Osmil Alexandrino e Maria Regina Henrique Alexandrino. Ingressou em fevereiro de 2000 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 2004. Em março de 2006 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV-UNESp-Jaboticabal, concluindo-o em fevereiro de 2008.

Dedico

Aos meus amados pais Osmil e Maria Regina por todo ensinamento e exemplo de vida, pelo carinho, compreensão e incentivo.

Agradeço:

A Deus, por sempre guiar meus passos e iluminar meus pensamentos.

Ao orientador Prof. Dr. Samir Issa Samara pela oportunidade, confiança e maneira de orientar que me fez crescer muito profissionalmente.

A técnica do laboratório Andréa Souza Ramos de Medeiros primeiramente pela amizade e incentivo, por ter se tornado, ao longo do tempo, uma irmã. Pelos ensinamentos, afinal você me ensinou todas as técnicas do laboratório com muita paciência e dedicação; e pela ajuda que sempre me ofereceu. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos irmãos Daniela e Emerson, aos meus cunhados Roberta e Saulo e aos meus queridos e amados sobrinhos Júlia e Pedro pelo incentivo, força e compreensão pela ausência. Amo todos vocês.

Ao Fabio Carvalho Dias, Mônica Oliveira e Ingrid Affonso Bortoloni, meus irmãos de laboratório, e ao Paulo Cesar da Silva pela amizade e ajuda que sempre me deram.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela ajuda quando necessária e pela amizade.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela ajuda, em especial ao Prof. Dr. Luís Antônio Mathias pela colaboração e sugestões feitas na qualificação dessa dissertação.

A Profa. Dra. Adolorata Bianco Carvalho, primeiro pela amizade, confiança e pelo exemplo de educadora. Agradeço também pela colaboração e sugestões feitas na qualificação dessa dissertação.

A Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro agradeço pela amizade e confiança, pela participação e colaboração na defesa dessa dissertação. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Fumio Honma Ito, pela participação e colaboração na defesa dessa dissertação.

A todos meus amigos da faculdade, do coral da UNESP, do Kung Fu pela amizade, companheirismo e por tantos momentos felizes que passamos juntos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Caracterização experimental.....	12
3.2 Procedimentos laboratoriais.....	13
3.2.1 Manutenção das culturas celulares.....	13
3.2.2 Multiplicação e titulação viral.....	14
3.2.2.1 Multiplicação do vírus padrão para o herpesvírus bovino tipo 1.....	14
3.2.2.2 Multiplicação do vírus padrão para o vírus da diarreia viral bovina tipo 1.....	14
3.2.2.3 Titulação viral.....	15
3.2.3 Pesquisa de anticorpos neutralizantes.....	16
3.2.3.1 Pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1.....	16
3.2.3.2 Pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o vírus da diarreia viral bovina tipo 1.....	17
3.2.3.3 Controle da TCID ₅₀	18
3.2.4 Reação de imunodifusão em gel de ágar para a Leucose Enzoótica Bovina.....	19
3.2.5 Análise estatística	19
4 RESULTADOS.....	21
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES.....	34
7 REFERÊNCIA.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Porcentagem (%) dos animais com reações positivas (R) na análise laboratorial da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina (LEB) e de virusneutralização para o BoHV-1 e o BVDV-1 separados pelo tipo de exploração da propriedade e pela faixa etária dos animais.....	22
TABELA 2.	Porcentagem (%) dos animais com reações positivas (R) na análise laboratorial da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina (LEB) junto com as médias geométricas (δ) dos títulos de anticorpos obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 e o BVDV-1, separados pelo tipo de exploração dos rebanhos	23
TABELA 3.	Porcentagem (%) de animais com reações positivas (R) na análise laboratorial de virusnetralização para o BoHV-1 e o BVDV-1 e da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina (LEB), separados pelo Estado de procedência das amostras.....	24
TABELA 4.	Porcentagem (%) de animais com reação positiva (R) na análise laboratorial de virusnetralização para o BoHV-1, separados pela faixa etária e tipo de exploração da propriedade.....	25
TABELA 5.	Porcentagem (%) de animais com reações positivas (R) na análise laboratorial de virusnetralização para o BVDV-1, separados pela faixa etária e tipo de exploração da propriedade.....	26
TABELA 6.	Porcentagem (%) de animais com reação positiva (R) na análise laboratorial de imunodifusão em gel de ágar para a LEB, separados pela faixa etária e tipo de exploração da propriedade.....	27
TABELA 7.	Porcentagem (%) de animais com reação positiva (P) na análise laboratorial de virusnetralização para o BoHV-1 e o BVDV-1 e da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina (LEB), tanto para uma enfermidade isolada ou em associação a outra, separados por propriedade.....	28

VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA PELA ASSOCIAÇÃO COM A DIARRÉIA VIRAL BOVINA E A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo verificar a variação da ocorrência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) pela associação com duas doenças virais imunossupressoras: a Diarréia Viral Bovina (BVD) e a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), em seis propriedades onde não se adota esquema de vacinação contra essas enfermidades. Amostras de soro sanguíneo foram analisadas no teste de virusneutralização (VN), para constatação de IBR e BVD, e Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), para a LEB. Foram selecionados cinco rebanhos bovinos, em propriedades localizadas em municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, sendo três de exploração leiteira, um de gado de corte e um misto, com animais soropositivos ao BoHV-1, além de um rebanho controle, sem anticorpos contra essa enfermidade. Das 278 amostras analisadas, 54,68% (152/278) foram positivas ao BoHV-1, 69,70% (194/278) ao BVDV-1 e 34,33% (96/278) ao VLEB. Na análise estatística, ao relacionar cada enfermidade com o tipo de exploração do rebanho e a idade dos animais, houve diferença significativa, indicando que estas variáveis são fatores de risco para as enfermidades estudadas. Em relação ao tipo de exploração, os rebanhos leiteiros foram mais suscetíveis ao BoHV-1 e a LEB (81,31% e 49,53% respectivamente, $\alpha = 1$) enquanto no rebanho de gado de corte o BVDV-1 teve maior ocorrência (94,74%, $\alpha = 1$). A idade foi fator de risco apenas para o BoHV-1 e a LEB, sendo os animais mais velhos os mais suscetíveis ($\alpha = 1$). As associações entre o BoHV-1 e o BVDV-1, e o BoHV-1 e a LEB também foram significativas ($\alpha = 5$ e $\alpha = 1$ respectivamente), indicando que em rebanhos infectados por BVDV-1 e/ou LEB, a probabilidade de se encontrar o BoHV-1 é maior do que naqueles onde não ocorre essas duas enfermidades.

Palavra-chave: diarréia viral bovina, fatores de risco, imunossupressão, infecção, leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina

VARIATION OF THE OCCURRENCE OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS BY ASSOCIATION WITH BOVINE VIRAL DIARRHOEA AND ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS

SUMMARY - The present research had as objective to verify the variation of the occurrence of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) by association with two viral infections that affect the immune system, Bovine Viral Diarrhoea (BVD) and enzootic bovine leukosis (EBL), in six farms where vaccination against these diseases was not adopted. Serum samples had been analyzed by the virus neutralization (VN) test for IBR and BVD diagnosis, and agar gel immunodiffusion (IDGA) test for EBL diagnosis. Five cattle herds with BoHV-1 seropositive animals had been selected in the states of São Paulo and Minas Gerais, three of them exploiting dairy cattle, one exploiting beef cattle and one exploiting mixed cattle, in addition to a control herd without seropositive animals. From 278 analyzed samples, 54.68% (152/278) reacted to the BoHV-1, 69.70% (194/278) to the BVDV-1, and 34.33% (97/278) to the EBLV. The statistic analysis showed a significant difference ($\alpha = 1$) in infection occurrence according to the kind of exploitation and the age of the animals. Dairy cattle were more sensitive to the BoHV-1 (81.31%) and to the EBLV (49.53%) and less to BVDV-1 infection (45.79%). Among the beef herds, the major occurrence was BVDV-1 infection (94.74%), followed by BoHV-1 (34.19%) and EBLV (3.95%). The age was a risk factor ($\alpha = 1$) only for BoHV-1 and EBLV. The associations between BoHV-1 and BVDV-1 infections ($\alpha = 5$) and between BoHV-1 and EBLV infections ($\alpha = 1$) also indicated that among BVDV-1 and/or EBLV infected herds the probability of finding BoHV-1 is higher than among herds where these two infections does not occur.

Key-words: Bovine viral diarrhoea, enzootic bovine leukosis, immunosuppression, infection, infectious bovine rhinotracheitis, risk factor

1. INTRODUÇÃO

O Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* (FENNER, 1987), gênero *Varicellovirus*. É conhecido também como vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecciosa Bovina (IBR/IPV) (DEL FAVA et al., 2002). O BoHV-1 foi classificado, por meio de técnicas de biologia molecular em três subtipos: BoHV-1.1, isolado de animais com problemas respiratórios, infertilidade e abortamento; BoHV-1.2a e BoHV-1.2b, isolados principalmente de casos de vulvovaginite e balanopostite, apesar de terem sido também encontrados em animais com problemas respiratórios (EDWARDS et al., 1990; MILLER et al., 1991; D'ARCE et al., 2002).

A partícula viral tem entre 70 e 110 nm de diâmetro e é constituída por um capsídeo icosaédrico (100nm), contendo DNA linear de fita dupla, rodeada pelo tegumento, que, por sua vez, é revestido por envelope lipoprotéico (120-200nm), no qual se localizam dez glicoproteínas (FENNER et al., 1974; FENNER, 1987, FENNER et al., 1993). As glicoproteínas são denominadas gB, gC, gD, gE, gH, gI, gL, gG, gK e gM. Cada uma delas diferencia-se em sua propriedade antigênica, molecular e função biológica nos processos de interação com a célula hospedeira e de replicação (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

A principal fonte de infecção do BoHV-1 é a espécie bovina (KAHRS, 1997). A porta de entrada do vírus é a mucosa respiratória, a mucosa genital e o epitélio conjuntival (TAKIUCHI et al., 2001; MUYLKENS et al., 2007). A enfermidade ocorre por transmissão horizontal, por meio do contato direto entre os animais e também pela cópula (KAHRS & SMITH, 1965), ou indiretamente, seja por aerossóis, ingestão de águas contaminadas ou fômites; o embrião e o feto podem infectar-se pela via vertical, que é a transplacentária (DEL FAVA et al., 2002).

A infecção é facilmente transmitida porque grandes quantidades de vírus são excretadas nas secreções respiratórias, oculares e genitais (muco prepucial e muco vaginal), infectando o gado (KAHRS, 1997). A inseminação artificial tem importante

papel na entrada da doença em rebanhos que nunca tiveram contato com o BoHV-1, por ser um meio de transmissão do vírus (PHILPOTT, 1993).

Existem fatores de risco associados à disseminação da doença. Mas, segundo diversos autores (BARBOSA et al., 2005; SOLIS-CALDERON et al., 2005; VAN SCHAIK et al., 2002; VAN SCHAIK et al., 1998), o mais importante é a introdução no rebanho de animais em período de incubação, em fase aguda ou latentemente infectados pelo vírus. Animais mais velhos são mais freqüentemente infectados, por terem maior probabilidade e tempo de contato com o vírus; machos são mais freqüentemente positivos que as fêmeas; quanto mais denso o rebanho maior a disseminação na propriedade; e a participação do gado em leilões e feiras agropecuárias aumenta a probabilidade de contato com animais infectados (BOELAERT et al., 2005; BARBOSA et al., 2005; SOLIS-CALDERON et al., 2005; VONK NOORDEGRAAF et al., 2004; VAN SCHAIK et al., 2002).

Após a infecção do animal, durante a fase aguda ocorre replicação viral nas células epiteliais da porta de entrada, principalmente na mucosa do trato respiratório ou na mucosa genital, causando necrose e apoptose nessas células (MUYLKENS et al., 2007). Conseqüentemente os sinais da doença aguda são sempre associados com a destruição dessas células (ENGELS & ACKERMANN, 1996). Existem dois mecanismos pelos quais o BoHV-1 pode infectar a célula: um modo é quando o vírus se liga aos receptores das células hospedeiras por meio de glicoproteínas específicas do envelope, conseguindo dessa forma penetrar nas células; e o segundo mecanismo é quando partículas virais conseguem passar diretamente para uma célula vizinha, evitando a ação dos anticorpos neutralizantes (MUYLKENS et al., 2007). Quando o vírus se dissemina no organismo infectado em decorrência de uma viremia, atinge grupos de tecidos e órgãos, causando uma das formas clínicas ou patológicas (ENGELS & ACKERMANN, 1996), como, por exemplo, aborto em vacas prenhes (MILLER et al., 1991).

O vírus também pode penetrar nas terminações nervosas periféricas locais e por via axonal retrógrada atingir os sítios de latência, principalmente neurônios do gânglio trigêmeo e sacral, onde o nucleocapsídeo permanece no núcleo da célula hospedeira

em forma não infecciosa ou latente; deste modo o vírus pode ser reativado quando os animais são expostos a fatores predisponentes estressantes, que diminuem a resistência imunológica, como tratamento com glicocorticóides, parição, transporte ou outras enfermidades (LEMAIRE et al., 1994; TIKOO et al., 1995).

A característica da latência é quando existe o genoma viral no interior dos neurônios ganglionares, sem produção de progênie viral (ENGELS & ACKERMANN, 1996). Este vírus em latência não é detectado por procedimentos virológicos convencionais e pode apresentar subseqüentes e intermitentes episódios de re-excreção viral, normalmente não acompanhados de sinais clínicos; e mesmo com o estabelecimento de imunidade celular e humoral, pós-infecção ou mesmo pós-vacinação, o estado de latência não é eliminado; com isso, uma vez infectado por BoHV-1, o animal será sempre portador e potencial transmissor do vírus por toda a sua vida produtiva (FENNER et al., 1993).

Quando acontece manifestações clínicas, o subtipo BoHV-1.1 é o agente etiológico responsável por febre, redução do apetite, respiração rápida, dispnéia associada a material mucopurulento nas passagens nasais e traquéia, dilatação das narinas (KAHRS & SMITH, 1965), tosse e queda na produção de leite (ROCHA, 1999). Em vacas prenhes, a viremia pode causar abortamento, bem como infertilidade, nascimento de bezerros débeis e natimortos (KAHRS & SMITH, 1965; WILSON, 1974; TIKOO et al., 1995; DEL FAVA, 1996). Frequentemente a inflamação da conjuntiva (McKERCHER & WADA, 1964) acompanha a forma respiratória clássica da IBR (KAHRS, 1997). A descarga ocular, inicialmente clara, pode tornar-se mucopurulenta, usualmente bilateral, com fotofobia (TIMONEY, 1971; RIET-CORREA et al., 1996).

O subtipo BoHV-1.2a é responsável por causar vulvovaginite pustular infecciosa nas vacas; e o BoHV-1.2b, balanopostite infecciosa nos touros (KAHRS, 1997; DEL FAVA, 1996). O curso da enfermidade clínica é de aproximadamente quatro a sete dias (RIET-CORREA et al., 1996). As lesões iniciam-se como pequenas pápulas de coloração avermelhadas na mucosa da vagina, do prepúcio e do pênis, evoluindo para pústulas; a mucosa da vagina e do pênis torna-se edemaciada, hiperêmicas e doloridas

(ROCHA, 1999). Os animais apresentam micção freqüente e, devido à dor, permanecem com a cauda levantada (KAHRS, 1997).

As evidentes perdas reprodutivas podem ser observadas por falhas na concepção, baixas taxas de fecundação e elevadas taxas de serviço por concepção (WHITE & SNOWDON, 1973). As vacas prenhes que se infectarem durante o segundo ou terceiro trimestre de gestação, a intensa replicação viral nos fetos, resultará em morte fetal e aborto (MILLER & VAN DER MATTEN, 1985). Todavia, quando os bezerros são infectados na fase final da gestação ou logo após o nascimento é mais comum ocorrer a forma sistêmica no recém nascido. Esta forma se caracteriza por infecção aguda com surgimento de lesões necróticas nas mucosas dos tratos respiratório e digestivo. Neste caso, os bezerros nascem mortos ou bastante debilitados, podendo vir a morrer em poucas horas (ROCHA, 1999).

No entanto, como todas essas manifestações clínicas não são patognomônicas, para diagnosticar o BoHV-1, aplica-se métodos laboratoriais indiretos, como provas sorológicas, ou diretos, que caracterizam o agente etiológico (ALFIERI et al., 1998). Os testes sorológicos mais utilizados detectam anticorpos específicos por meio de técnicas de virusneutralização (VN) ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA); entretanto, esses testes são de difícil interpretação em rebanhos que adotam a vacinação profilática, pois essas metodologias são incapazes de diferenciar os anticorpos induzidos por vírus vacinal daqueles oriundos da exposição natural ao vírus de campo (TAKIUCHI et al., 2001). Por outro lado, o isolamento do BoHV-1 em cultivo celular é considerado o método padrão de diagnóstico direto (TAKIUCHI et al., 2001).

O diagnóstico com caracterização etiológica, também pode ser obtido por meio da imunofluorescência e imunoperoxidase diretas, e mesmo hibridização e reação em cadeia de polimerase (PCR) (ALFIERI et al., 1998). Segundo MASRI et al. (1996), a técnica de PCR tem capacidade de constatar o BoHV-1 precocemente, a partir do quarto dia pós-infecção, antes mesmo do aparecimento de anticorpos detectáveis pelos procedimentos sorológicos tradicionais. Comprovada a enfermidade, o tratamento dos doentes só é possível para amenizar os sinais clínicos, e evitar principalmente o risco de complicações por aparecimento de infecções secundárias, já que não existe uma

terapia específica (MOREIRA, 2004). Portanto a melhor maneira de impedir uma disseminação do vírus é por meio da prevenção (DEL FAVA, 1996).

No Brasil, em certos casos, acredita-se que com o uso de vacinas convencionais somente em animais infectados, é possível o convívio sem transmissão do vírus, entre os infectados e os não-infectados. Este modelo é recomendado somente onde a prevalência da enfermidade no rebanho está entre 20% e 50%, o que possibilita aos criadores fazer o descarte gradual e em tempo mais longo dos animais reagentes; em propriedades onde a prevalência é superior a 50%, ou onde há necessidade premente de evitar sinais clínicos para reduzir perdas da produção, o controle com o uso de vacinas convencionais em todo o rebanho é o modo de atuação indicado (DEL FAVA, 1996). Já a prática simplista de vacinação em rebanhos com baixa prevalência de infecção não deve ser adotada, sendo recomendada, nestes casos, uma política de descarte dos animais soropositivos (STRAUB, 1991).

Por outro lado, apesar das vacinas serem efetivas na redução do impacto clínico causado pelo BoHV-1, existe pesquisa que coloca em dúvida a sua capacidade de prevenir a difusão da enfermidade (MUYLKENS et al., 2007).

O fundamento de todas essas preocupações se deve ao fato que o BoHV-1 está presente em plantéis de bovinos de praticamente todo o mundo, todavia as taxas de rebanhos e animais portadores do vírus variam consideravelmente (DEL FAVA et al., 2002). O conhecimento histórico da enfermidade teve início quando o vírus foi isolado pela primeira vez por MADIN et al. (1956) nos Estados Unidos. No Brasil, os primeiros isolamentos foram feitos por ALICE (1978), no Estado da Bahia, examinando raspados das pústulas vaginais de vacas, e por MUELLER et al. (1978), no Estado de São Paulo, a partir de um rim de feto bovino proveniente de matadouro.

Nos países europeus, as taxas de infecção de rebanho são muito variáveis: Holanda e Bélgica 60 a 90%, França 20%, Alemanha 30 a 50% e Inglaterra 50%, enquanto outros, como Suíça, Áustria, Noruega, Finlândia, Dinamarca e Suécia, há algum tempo são considerados países livres (ACKERMANN et al., 1990a e 1990b; VAN OIRSCHOT et al., 1996). No Canadá, o título de anticorpos encontrado por WALDNER (2005), testando 2.512 amostras de soro bovino para IBR, foi relativamente alto (>1:80)

em 512 (20,4%), moderado ou leve (1:14 a 1:80) em 1.621 (64,6%) e negativo ou suspeito (<1:14) em 378 (15,1%).

No Brasil, vários levantamentos sorológicos, regionais, têm demonstrado uma alta freqüência de animais e rebanhos positivos, com taxas que variam de 28,9% a 82,7% (GALVÃO et al., 1963; RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995; MOLNÁR et al., 2001; ROCHA et al., 2001; ALFIERI, 2001 citado por TAKIUCHI et al., 2001). Pelo fato da situação epidemiológica da infecção apresentar caráter endêmico, tanto em plantéis destinados à produção de leite quanto de carne; a adoção de uma política nacional de erradicação, pelo menos a curto prazo, é inviável (ALFIERI et al., 1998).

Outra enfermidade com destaque epidemiológico é o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (BOLIN & RIDPATH, 1996). O BVDV é esférico, mede 40 a 60 nm de diâmetro, tem uma cadeia simples de RNA como material genético e possui envelope glicoprotéico proveniente da membrana das células do hospedeiro infectado (RIDPATH, 2005).

Particularidades antigênicas permitem classificar esse vírus em dois genótipos distintos: BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 (PELLEGRIN et al., 1994). Os genótipos virais ainda são classificados em subgenótipos (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2003). De acordo com a capacidade de produzir alterações microscópicas em culturas de células, os isolados de BVDV também podem ser classificados em dois biótipos: citopatogênico (C) e não citopatogênico (NC) (GOYAL & RIDPATH, 2005).

Quando este vírus infecta o animal, provoca uma enfermidade que pode ser clínica ou subclínica, com acometimento do sistema respiratório, reprodutivo, imune e digestivo dos bovinos (BOLIN & RIDPATH, 1996). Os sinais clínicos encontrados incluem depressão, anorexia, descarga oculonasal, ocasionalmente lesões orais caracterizadas por ulcerações e erosões, diarréia, decréscimo na produção de leite e morte repentina em alguns casos (BAKER, 1995).

Nas infecções pelo BVDV seguida de morte normalmente se devem a infecções bacterianas secundárias (BÖTTCHER et al., 1993). O processo mais preocupante é que o BVDV desencadeia um efeito imunossupressor, pois os linfócitos de animais

infectados possuem resposta de memória diminuída para outros patógenos (LAMONTAGNE et al., 1989), independentemente de ser uma infecção branda ou aguda, fazendo com que aumente a patogenicidade de outros microorganismos (HOLLAND et al., 1993). Essa situação proporciona um aumento considerável na incidência e na severidade de doenças do trato respiratório, como, por exemplo, as causadas pelo BoHV-1 (POTGIETER, 1997).

Em animais prenhes, o BVDV também pode causar morte fetal, reabsorção, aborto, mumificação, deformidades congênitas, nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (LARSON, 1996; FRAY et al., 2000), natimortos, nascimento de bezerros fracos, débeis, prematuros ou com alterações no crescimento (KRAMPS et al., 1999). A infecção no estágio final de gestação pode comprometer o sistema imune dos bezerros (FRAY et al., 2000). Segundo LARSON (1996), o BVDV pode levar ao aborto em qualquer fase da gestação, só que a maior ocorrência concentra-se no primeiro trimestre. Este aborto se deve a transmissão vertical normalmente precedida pela transmissão horizontal (HOUE, 1995).

A transmissão horizontal pode ser direta ou mesmo indireta, por meio do contato com excreções, secreções e fômites contaminados (GOYAL & RIDPATH, 2005), sendo o principal fator na disseminação natural do BVDV a existência de um animal persistentemente infectado (PI). O animal PI torna-se imunologicamente tolerante ao BVDV, e por meio dessa fonte de infecção o vírus se mantém na população bovina. A situação se agrava ainda mais porque fêmeas PI geram descendência PI (DUBOVI, 1998).

A partir destes conhecimentos pode-se caracterizar os principais fatores de risco associados ao BVDV: entrada de animal PI no rebanho, vacas sadias que sofrem a infecção aguda durante o estado de gestação e a presença de animal transitoriamente infectado (GOYAL & RIDPATH, 2005). Outros fatores que contribuem com a disseminação dessa enfermidade no rebanho são a densidade da população na propriedade, que quanto maior, mais fácil será a disseminação (SOLIS-CALDERON et al., 2005); o tipo de exploração comercial da propriedade sendo, segundo QUINCOZES et al. (2007), a mista a mais propensa ao BVDV, seguida pela exploração de carne e

por último a exploração leiteira. Quanto à idade, animais mais velhos apresentam maiores chances de exposição ao vírus e, portanto com maior probabilidade de sofrerem a infecção (MAINER-JAIME et al.,2001).

Os animais infectados pelo BVDV podem apresentar sinais clínicos que são muito inespecíficos, de forma que sempre é necessária a ajuda de um exame laboratorial para comprovação da enfermidade (DONATE & MAZZUCHELLI, 1995). A sorologia é uma ferramenta auxiliar importante para o diagnóstico da doença (CHASE et al., 2003). O método sorológico de diagnóstico indireto mais utilizado para determinar anticorpos contra o BVDV é a VN (BROCK, 1995). O teste de ELISA é outro método sorológico eficiente que apresenta alta especificidade e sensibilidade, porém com desvantagem de ser qualitativo e não possibilitar uma titulação de anticorpos como a VN (CHASE et al., 2003).

A facilidade da transmissão possibilita a BVD ter uma distribuição geográfica cosmopolita, tanto que foi estimada que 50% a 90% da população bovina adulta do mundo apresentam anticorpos no soro sanguíneo contra o BVDV (KRAMPS et al., 1999). Trabalho realizado no Brasil constatou 23,4% de amostras reagentes em 45,3% das propriedades pesquisadas no Estado do Rio Grande do Sul (KRAHL et al., 1997). Na avaliação da prevalência de animais com anticorpos contra o BVDV em 287 soros de bovinos colhidos em matadouros de diversas regiões do Estado de Minas Gerais, FIGUEIREDO et al. (1997) encontraram 61,47% das amostras reagentes.

Mais abrangente, a Seção de Virologia do Instituto Biológico em São Paulo realizou, no período de julho de 1995 a agosto de 1997, exames para BVD em 4.065 soros de rebanhos com problemas reprodutivos originários de vários estados, cujas análises mostraram que 47,7% das amostras foram reagentes (PITUCO & DEL FAVA, 1998). Em outro trabalho, SAMARA et al. (2004) encontraram pelo menos um animal reagente no teste de VN do BVDV em todas as dez propriedades pesquisadas, sendo que das 376 amostras de vacas analisadas, 57,56% das amostras soropositivas provinham das regiões Sul do Estado de Minas Gerais e 56,49% do Nordeste do Estado de São Paulo.

Assim como as enfermidades anteriormente descritas, outra doença que também afeta rebanhos e tem importância econômica dentro da bovinocultura é a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), que muitas vezes pode ser confundida com outras formas não contagiosas de leucose. A leucose esporádica bovina é uma dessas formas não contagiosa, de etiologia ainda não esclarecida, mas de importância restrita à individualidade clínica (TOSTES, 2005). Esta leucose esporádica pode apresentar-se na forma juvenil, que atinge principalmente bovinos de até seis meses, sendo marcada por amplas infiltrações em órgãos linfóides; na forma tímica, caracterizada na maioria das vezes por proeminentes lesões tumorais no timo de bovinos na faixa etária entre seis meses e dois anos de idade; e na forma cutânea, exteriorizada pela presença de nódulos tumorais disseminados no tecido epitelial, que ocorre em bovinos de qualquer idade, sendo mais comum na faixa etária entre dois e três anos (PARODI, 1987; BLOOD & RADOSTITS, 1991).

Bem mais conhecida, a LEB é uma doença contagiosa, causada por um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, cujo gênero é o *Deltaretrovirus* (LICURSI et al., 2003). Economicamente a LEB causa prejuízos não somente pela morte súbita de animais, mas também por restrições, por parte de alguns países, à movimentação de bovinos soropositivos e produtos como sêmen, por exemplo (VAN DER MAATEN & MILLER, 1990; PELZER, 1997), condenação de carcaças em matadouros (MECHAM et al., 2005) e perdas relativas ao rebanho ou a animais individualmente, como diminuição da produção de leite, emagrecimento ou predisposição a outras infecções por ser uma enfermidade imunossupressora, existindo inclusive, até mesmo medo por parte do público em geral, de que a enfermidade seja uma zoonose (AMORIL, 2005, TRAININ et al., 2005).

A LEB é uma enfermidade crônica que acomete geralmente animais acima de dois anos de idade (TRAININ et al.; 2005). A infecção pode resultar em manifestações que academicamente pode ser separadas em três fases diferentes: a primeira, na qual o animal permanece assintomático (60 a 65%) e também ocorre a soroconversão; na segunda fase, o animal desenvolve somente uma linfocitose persistente (20-30%) caracterizada pelo aumento no número de leucócitos e linfócitos em três desvios

padrões acima da leitura normal; e a terceira fase que é clínica, é caracterizada pelo desenvolvimento de linfoma maligno (1 a 5%), geralmente fatal (SAMARA et al.; 1997; DUS SANTOS et al., 2007).

O linfoma se desenvolve causando linfoproliferações tumorais multicêntricas ou localizadas, ou ainda tumorações em órgãos linfóides antecedidas por sinais clínicos variáveis como paralisia, emagrecimento, apatia e aumento de volume de linfonodos superficiais, que são mais comuns (AMORIL, 2005). Com a infecção, ocorre a eliminação viral que permite a transmissão da LEB principalmente pela via horizontal, embora a transmissão vertical intrauterina ou, por meio do colostro da mãe infectada também ocorra (JOHNSON & KANEENE, 1992; STRAUB, 1987; FERRER, 1980). Somente pelas manifestações clínicas não é possível diagnosticar a enfermidade. Sendo assim, empregam-se provas laboratoriais como a IDGA que é eficiente, prática e tem um custo-benefício excelente (FERRER, 1980; JOHNSON & KANEENE, 1992). O teste ELISA é também um método bastante utilizado principalmente pela alta sensibilidade, pela aceitável especificidade aliada à praticidade e à rapidez (CARLI et al., 1993).

Outra grande preocupação é a distribuição geográfica, pois a LEB está difundida por todos os continentes. Pelos trabalhos epidemiológicos com levantamentos sorológicos, GARCIA et al. (1991) afirmam que os índices da LEB variam de 12,5% a 70,9%, dependendo da região e do tipo de animais testados. MORAES et al. (1996), encontraram uma prevalência de 9,2% no Estado do Rio Grande do Sul; MEGID et al. (2003) encontraram uma prevalência de 47,4% no Estado de São Paulo. Já no Estado de Minas Gerais a prevalência encontrada por LEITE et al. (1984) foi de 70,9%.

Em um trabalho realizado por MOLES et al. (2002) no Altiplano Central da República Mexicana, num total de 567 amostras examinadas, a prevalência de IBR foi de 69,5%, e num total de 436 amostras, a prevalência de BVD foi de 72,3%. Pelo exame do gado leiteiro em quatro províncias do Canadá, TIWARI et al. (2005) determinou prevalência de 26,8% para LEB e de 38,1% para BVDV.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a possibilidade de variação na ocorrência da IBR quando houver associação dessa enfermidade com pelo menos uma das enfermidades virais imunossupressoras, quais sejam, a BVD e a LEB.

2.2 Objetivos específicos:

- determinar a frequência de BVD e LEB em bovinos de propriedades previamente selecionadas, cujos rebanhos estão infectados com IBR;
- correlacionar o nível de comprometimento de animais acometidos por IBR com a presença de BVD e/ou LEB no rebanho; e
- verificar se os níveis de infecção viral nos rebanhos das propriedades selecionadas ocorrem por algum fator possível de determinação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização experimental

Para a seleção das propriedades desse trabalho foram colhidas amostras de sangue em 10 rebanhos bovinos, que não adotavam vacinação contra as viroses em estudo. As propriedades foram identificadas como P1 a P10, estando cinco localizadas no Estado de Minas Gerais (Machado, Poço Fundo e São Gonçalo do Sapucaí) e cinco no Estado de São Paulo (Guariba, Jaboticabal, Pedregulho, São Carlos e São José do Rio Preto). As propriedades foram selecionadas por meio de testes sorológicos para IBR numa amostragem representativa do rebanho bovino, por meio da colheita de sangue de pelo menos 10 animais de cada propriedade, com o cuidado da aleatoriedade. Das amostras colhidas por propriedade, cinco eram de animais jovens (nove a 18 meses de idade), portanto sem a possibilidade de serem reagentes por anticorpos de origem colostrar; e as demais amostras colhidas de animais considerados adultos, com idade igual ou superior a 24 meses.

Essa triagem (apêndice nas páginas 45 a 51) permitiu a seleção de cinco propriedades experimentais, sendo três de exploração leiteira, uma de exploração mista e outra de exploração de gado de corte, que tinham animais reagentes ao BoHV-1, e uma propriedade controle, de exploração leiteira, onde nenhum animal era reagente. Problemas inerentes a pesquisa de campo ocorreram, como no caso de uma propriedade (P9), que mesmo atendendo as exigências sanitárias do projeto, não foi selecionada, pois o proprietário não autorizou a colheita de sangue de todos os animais. Mesmo assim, foi possível montar o experimento nas outras propriedades identificadas como P1, P2, P3, P4, P5 e P6 (controle).

Na segunda etapa do estudo foram colhidas amostras de sangue de todos os animais dos rebanhos selecionados. As alíquotas foram obtidas por punção da veia caudal mediana ou jugular dos animais, independentemente da idade e recolhidas em frascos de “vacutainer” esterilizados, sem anticoagulante e com agulhas descartáveis. No final foram contabilizadas 351 amostras de sangue que, levadas ao laboratório

foram dessoradas e armazenadas em frascos esterilizados tipo “eppendorf”, à temperatura de -20°C , até o momento do uso.

3.2 Procedimentos laboratoriais

3.2.1 Manutenção das culturas celulares

Foi utilizada a linhagem celular Madin & Darby Bovine Kidney (MDBK) para a reação de VN em microplacas e para a multiplicação das estirpes virais em garrafas de poliestireno descartáveis para cultivo celular TPP®, com área de 150 cm^2 . As culturas de células foram cultivadas em monocamadas. Como meio de manutenção utilizou-se o “Minimum Essential Medium” (Eagle – MEM) Gibco®, filtrado em filtro Millipore de $0,22\text{ }\mu\text{m}$, pH 7, sem adição de antibiótico, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio e de 10% de soro fetal bovino (SFB) Cultilab® livre de *Pestivirus* e de anticorpos contra o BVDV.

As garrafas com culturas celulares foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C por um período de 72 horas e então feitos os subcultivos. Inicialmente desprezava-se o meio de cultura e desprendia as células da garrafa adicionando-se solução de tripsina-versene Difco® a 0,2%. As células então foram ressuspendidas com meio de manutenção e uma alíquota retirada para contagem em câmaras de Neubauer. Feito os cálculos, preparava-se a suspensão com $3,0 \times 10^5$ céls./mL para colocação nas reações de VN, e com 200.000 céls./mL para outros subcultivos de células em garrafas de 75 cm^2 que recebiam meio acrescidos de 10% de SFB. A seguir, as garrafas eram colocadas em estufa a temperatura de 37°C para formação de novo tapete celular para utilização posterior.

3.2.2 Multiplicação e titulação viral

3.2.2.1 Multiplicação do vírus padrão para o herpesvírus bovino tipo 1

A amostra do BoHV-1 biotipo citopatogênico (estirpe *Nebraska*) foi multiplicada em células MDBK cultivadas em monocamada, como descrito no item 3.2.1, utilizando-se garrafas com área de 75 cm².

Para a multiplicação do vírus padrão foi inoculado 1mL da suspensão do BoHV-1 nas garrafas com a monocamada de células formada após 24 horas a partir do subcultivo inicial com $3,0 \times 10^5$ cél./mL, logo após remoção do meio de manutenção. O sistema foi incubado em estufa à temperatura de 37°C por um período de 60 minutos, para ocorrer a adsorção do vírus às células.

Transcorrido esse tempo, foram adicionados 5 mL do meio de manutenção. Novamente a garrafa foi submetida a incubação em estufa à temperatura de 37°C até que o tapete celular apresentasse aproximadamente 90% de efeito citopatogênico (ECP).

Assim que a monocamada apresentou o ECP desejável, o inóculo foi submetido ao congelamento à temperatura de -20°C, seguido de rápido descongelamento em água à temperatura de 37°C, para rompimento das células e conseqüentemente liberação de maior quantidade de partículas virais. Repetiu-se novamente o congelamento e descongelamento. Em seguida, o inóculo foi clarificado por centrifugação a 1.800 G à temperatura de 4°C por um período de 15 minutos. O sobrenadante contendo as partículas virais foi distribuído em criotubos, no volume de 0,7 mL, depois vedados e armazenados em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C. Uma dessas alíquotas foi descongelada e submetida à titulação viral.

3.2.2.2 Multiplicação do vírus padrão para o vírus da diarreia viral bovina tipo 1

Para o procedimento de multiplicação da amostra do BVDV-1 citopatogênico (estirpe Singer) foi seguido o mesmo protocolo utilizado para o BoHV-1.

As diferenças são a quantidade de célula colocada na garrafa para formação da monocamada do tapete celular, que no caso do BVDV-1 foram $2,0 \times 10^5$ céls./mL; e durante o período de adsorção viral ao tapete celular, foram realizados pequenos movimentos na garrafa, a cada 10 minutos, para facilitar uma melhor adsorção do vírus.

3.2.2.3 Titulação viral

Após ser armazenada por um período mínimo de 24 horas em nitrogênio líquido, à temperatura de -196°C , uma das alíquotas (itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2) foi descongelada e submetida à titulação viral. A metodologia utilizada foi a preconizada pelo “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals” (OIE, 2005), sendo realizado o mesmo procedimento tanto para a estirpe viral do BoHV-1 *Nebraska* como para o BVDV-1 *Singer*.

Para a titulação viral foi utilizada placas de microtitulação descartáveis de poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato TPP®. Em cada poço acrescentaram-se 50 μL de meio de manutenção Eagle-MEM (pH 7), exceto na nona coluna, que permanecia vazia para separar as cavidades com diluições virais daquelas com os controles celulares. Em seguida, a alíquota de vírus descongelada foi diluída, em tubos de ensaio, em escala logarítmica seriada de base 10 (10^{-1} a 10^{-8}), mantendo sempre os tubos em banho de gelo, para evitar a queda do título viral. Em cada uma das oito primeiras colunas da placa de microtitulação foi colocada a respectiva diluição (a primeira coluna recebeu a diluição 10^{-1} e assim por diante, até que a oitava coluna recebeu a diluição 10^{-8}).

Depois foi acrescentado em cada poço da placa, 50 μL de suspensão de células MDBK na concentração de $3,0 \times 10^5$ céls./mL. As colunas de número 10, 11 e 12 foram os controles celulares e receberam apenas 100 μL de meio e a suspensão celular na mesma quantidade e concentração do restante da placa. Terminado esse procedimento, a placa foi incubada em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO_2 . Decorridas 96 horas a placa foi observada em microscópio invertido para pesquisar os efeitos citopáticos característicos de cada vírus, nas

diferentes diluições. O título viral foi calculado segundo o método REED & MUENCH (1938).

3.2.3 Pesquisa de anticorpos neutralizantes

3.2.3.1 Pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para o IBR foi realizada segundo o protocolo preconizado pela OIE (2005), usando a estirpe Nebraska do BoHV-1 proveniente da Universidade Estadual de Londrina - PR.

As amostras de soro sangüíneo foram descongeladas e colocadas em banho-maria a 56°C por um período de 30 minutos para inativação do sistema complemento.

Para cada placa de microtitulação foram examinadas quatro amostras em duplicata. Seguindo a metodologia preconizada, na primeira coluna foram adicionados 100µL de meio Eagle-MEM, nas demais colunas, exceto na terceira onde a diluição foi de 1:2, foram acrescentados 50µL do mesmo meio. Em seguida, foram adicionados 50µL da amostra na segunda, terceira e quarta colunas. Como próxima etapa foi feito a diluição seriada, a partir da quarta coluna, que representou a diluição 1:4, até a décima segunda coluna, onde a diluição foi de 1:1024. Após este processo, em cada cavidade, exceto na primeira e segunda coluna, que foram controles, foram adicionados 50µL da suspensão viral ajustada a uma concentração de 200 TCID₅₀. Para o preparo das 200 TCID₅₀, foi subtraído o logaritmo de 200 TCID₅₀ (2,3) do título viral (descrito no item 3.2.2.3). Do resultado da subtração foi obtido o antilogaritmo correspondente. Este valor representava o volume final da diluição que continha as 200 TCID₅₀. Após a adição dessa suspensão viral as microplacas foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ por um período de 18 a 24 horas.

Após a incubação da mistura soro com vírus e meio, foi adicionado em cada cavidade da placa 100 µL de uma suspensão de células MDBK, numa concentração de $3,0 \times 10^5$ céls/mL, cultivadas em MEM suplementado com 10% de SFB.

Terminada essa etapa, a microplaca foi novamente incubada à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ por um período de 72 horas, seguida de leitura do efeito citopático característico. Foram utilizados em cada prova o controle do vírus e o controle de células MDBK. A interpretação do teste considerou positiva a amostra de soro 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 200 TCID₅₀.

3.2.3.2 Pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o vírus da diarreia viral bovina tipo 1

A técnica de VN para o BVDV-1 foi semelhante à empregada para o BoHV-1, porém usando a estirpe Singer da BVDV, proveniente do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - RS. Após distribuir as amostras a serem testadas nas cavidades das microplacas, foi feita a diluição seriada com o meio (a primeira diluição foi 1:10 na terceira coluna e chegou em 1:5120 na décima segunda coluna), para depois adicionar a suspensão viral com 100 TCID₅₀. O preparo da suspensão viral com 100 TCID₅₀ foi feito da mesma forma que do BoHV-1, porém como o BVDV-1 utiliza 100 TCID₅₀, subtrai do título viral o logaritmo de 100 TCID₅₀ (2,0). Após adicionar a suspensão viral com as 100 TCID₅₀, as microplacas foram incubadas em estufa com atmosfera controlada com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C durante uma hora.

Decorrido o período da incubação, foram colocadas as células, na mesma concentração que na VN feita para o BoHV-1, e novamente incubaram-se as microplacas à temperatura de 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 96 horas, seguida de leitura do efeito citopático característico. O título neutralizante foi expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar 100 TCID₅₀. Para esse caso, a OIE (2005) preconiza como positiva a amostra de soro que neutraliza o vírus a partir da diluição 1:10.

3.2.3.3 Controle das TCID₅₀

Todas as vezes que se fazia os teste de VN tanto para o BoHV-1 quanto para o BVDV-1, verificava se as TCID₅₀ estavam dentro do intervalo de validação do teste preconizado pela OIE (2005), que para o BoHV-1 é de 20 a 200 TCID₅₀ e para o BVDV-1 é de 30 a 100 TCID₅₀.

Utilizou-se a mesma diluição que definiu as 200 TCID₅₀ (item 3.2.3.1) e as 100 TCID₅₀ (item 3.2.3.2) nas placas de validação da reação, e a partir dessa foram obtidas as diluições que definiram 0,2 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀ e 20 TCID₅₀ para o BoHV-1 e 1 TCID₅₀, 10 TCID₅₀ e 30 TCID₅₀ para o BVDV-1.

Com as diluições preparadas, utilizando uma placa de microtitulação com 96 cavidades, foram colocadas nas quatro primeiras colunas, as respectivas diluições contendo 0,2 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀, 20 TCID₅₀ e 200 TCID₅₀ nos testes para o BoHV-1 e 1 TCID₅₀, 10 TCID₅₀, 30 TCID₅₀ e 100 TCID₅₀ nos testes para o BVDV-1. A quinta e a décima primeira coluna consistiam em colunas limítrofes, sendo assim, nenhum reagente foi adicionado a elas. A última coluna desta placa foi destinada ao controle da suspensão celular.

As outras cinco colunas que ainda restavam na placa foram utilizadas para fazer um controle do título viral, que estava sendo utilizado naquele teste, tanto do BoHV-1 quanto do BVDV-1, da mesma forma descrita no item 3.2.2.3, pois a suspensão viral utilizada na reação foi obtida a partir de uma das diluições 10^{-1} a 10^{-8} . Sabendo previamente o título viral, este foi confirmado utilizando apenas as diluições com intervalos próximos ao título.

Foram adicionados 50 µL de meio de manutenção Eagle-MEM e 50 µL de cada diluição por cavidade nas colunas correspondentes às diluições desejadas, com oito repetições. Transcorridos o período de incubação necessários para cada reação (18 a 24 horas para o BoHV-1 e 1 hora para o BVDV-1), pois esta placa foi submetida aos mesmos intervalos de tempo da reação de VN, foram adicionados, em todas as cavidades da placa, 50 µL da suspensão viral de células contendo $3,0 \times 10^5$ céls./mL em meio de manutenção Eagle-MEM acrescido de 10% de SFB.

Terminada a reação esta placa voltava a ser incubada em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂. A leitura foi realizada antes das demais placas da reação de VN, pois os resultados nela encontrados validavam ou não o teste realizado.

3.2.4 Reação de Imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina

O teste de IDGA foi realizado usando Kit comercial que contém um frasco com antígeno (Ag) da gp51 e outro com soro controle padrão (SCP). Para realização do teste foram seguidas as recomendações do fabricante (TECPAR[®], Paraná). Deste modo foi feito uma camada basal do ágar, preparado com 0,9% de ágar Noble Difco[®] em solução tampão com pH de 7,3, em lâmina de microscopia, com dimensões de 76 mm X 26 mm. Depois de seca a base, foi colocado sobre ela 4,5 mL do ágar, e a lâmina foi mantida em temperatura ambiente (20°C a 25°C), para a evaporação da umidade excedente e solidificação do ágar.

Para perfuração do ágar, utilizou-se um cortador padrão, em forma de roseta, composto por sete cilindros de 4 mm de diâmetro, que permitiu furar seis cavidades periféricas eqüidistantes 3 mm entre si e um furo central, também eqüidistante 3 mm dos demais, todos com capacidade volumétrica individual de aproximadamente 30 µL. Foi perfurada uma roseta em cada lâmina, e removido o cilindro de ágar com auxílio de uma ponteira conectada a uma bomba a vácuo. Pronta a lâmina, foram colocados o SCP e o soro a ser testado, intercalados nas cavidades periféricas, e o Ag, na cavidade central. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente em recipiente de câmara úmida. As leituras foram feitas a cada 24 horas após o início de incubação, pelo menos por cinco vezes, completando assim no mínimo 120 horas de incubação.

3.2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste do χ^2 para verificar se houve diferença significativa em relação às enfermidades estudadas com a faixa etária e o tipo de

exploração da propriedade bem como a possível associação do BoHV-1 com o BVDV-1 e a LEB. Como houve diferença significativa no teste do χ^2 , foi realizado o teste do desdobramento do χ^2 como comparação de médias, para verificar qual a faixa etária ou o tipo de exploração que diferiu significativamente (ZAR, 1999).

4. RESULTADOS

Na primeira etapa da pesquisa foram selecionadas as propriedades onde existia a IBR realizando-se testes sorológicos numa amostragem representativa de 10 rebanhos bovinos, com o cuidado da amostragem aleatória, colhendo-se sangue pelo menos de 10 animais de cada propriedade. Essa triagem permitiu uma seleção de cinco propriedades, identificadas por P1, P2, P3, P4 e P5, que tinham animais reagentes ao BoHV-1, e a propriedade controle (identificada por P6), onde nenhum animal era reagente nas amostras da triagem. Outro cuidado deste estudo foi selecionar rebanhos que obrigatoriamente não recebiam vacinação contra o BoHV-1 e o BVDV-1.

Na segunda etapa foram colhidas 351 amostras de sangue de bovinos originários das seis propriedades de pequeno (P1, P2 e P3) e médio (P4 e P5) porte, e da propriedade controle (P6). Do total de 351 amostras, 278 foram originárias de rebanhos com anticorpos contra a IBR sendo três propriedades de exploração leiteira (P1, P2 e P3) totalizando 107 animais, uma de exploração mista (P4), com 95 animais, e outra de exploração de gado de corte (P5), com 76 animais. O rebanho controle possuía 73 animais.

Das 278 amostras analisadas, originárias das cinco propriedades selecionadas, exceto a propriedade controle, 38,49% (107/278) foram de propriedades com tipo de exploração leiteira, 34,17% (95/278) de exploração mista e, 27,34% (76/278) de exploração de gado de corte. Quanto à faixa etária, 12,59% (35/278) foram de bezerras, entre zero e oito meses de idade com possível presença de anticorpos de origem colostrar, 23,38% (65/278) foram jovens, entre nove e 24 meses, sem a possibilidade de apresentarem anticorpos de origem colostrar, e 64,03% (178/278) foram adultos, maiores que 24 meses.

Como pode ser visto na tabela 1, no total das amostras colhidas nas propriedades selecionadas, exceto a propriedades controle, 54,68% (152/278) dos animais foram positivos para o BoHV-1; 69,78% (194/278) para o BVDV-1 e 34,53% (96/278) para o VLEB.

Nas amostragens provenientes de rebanhos leiteiros, 81,31% (87/107), 45,79% (49/107), 49,53% (53/107) foram positivas ao BoHV-1, BVDV-1 e VLEB, respectivamente. No rebanho misto, o índice de soropositividade foi de 32,63% (31/95), 76,84% (73/95), 42,11% (40/95) para o BoHV-1, BVDV-1 e VLEB, respectivamente. No rebanho de corte, 44,74% (34/76), 94,74% (72/76) e 3,95% (3/76) foram positivas ao BoHV-1, BVDV-1 e VLEB, respectivamente.

Em relação à faixa etária, os bezerros apresentaram 37,14% (13/35), 40,0% (14/35) e 0% de positividade ao BoHV-1, BVDV-1 e VLEB, respectivamente; os jovens apresentaram 36,92% (24/65), 73,85% (48/65), 23,08% (15/65) de positividade ao BoHV-1, BVDV-1 e VLEB, respectivamente. Nos adultos o índice de soropositividade foi de 64,61% (115/178), 74,16% (132/178) e 45,51% (81/178) para o BoHV-1, BVDV-1 e VLEB, respectivamente.

TABELA 1. Porcentagem (%) dos animais com reações positivas (R) na análise laboratorial da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina (LEB) e de virusneutralização para o BoHV-1 e o BVDV-1 separados pelo tipo de exploração da propriedade e pela faixa etária dos animais

Categorias	N° de amostras analisadas	%	BoHV-1		BVDV-1		LEB		
			R	%	R	%	R	%	
Tipo de exploração	Leite	107	38,49	87	81,31	49	45,79	53	49,53
	Mista	95	34,17	31	32,63	73	76,84	40	42,11
	Corte	76	27,34	34	44,74	72	94,74	3	3,95
Total	278	100	152	54,68	194	69,78	96	34,53	
Faixa etária	Bezerros	35	12,59	13	37,14	14	40,0	0	0
	Jovens	65	23,38	24	36,92	48	73,85	15	23,08
	Adultos	178	64,03	115	64,61	132	74,16	81	45,51
Total	278	100	152	54,68	194	69,78	96	34,53	

Analisando os dados por propriedade, pode-se observar, na tabela 2, que a propriedade P1 apresentou 83,87% (26/31) de animais positivos ao BoHV-1, 45,16%

(14/31) positivos ao BDVD-1 e 61,29% (19/31) positivos ao VLEB. A P2 teve 80,95% (34/42) de animais positivos ao BoHV-1, 71,43% (30/42) positivos ao BVDV-1 e 21,43% (9/42) positivos ao VLEB. A P3 teve 79,41% (27/34) de positivos ao BoHV-1, 14,71% (5/34) positivos ao BVDV-1 e 73,53% (25/34) positivos ao VLEB.

A P4, de exploração mista, apresentou 32,63% (31/95) dos animais positivos ao BoHV-1, 76,84% (73/95) de positivos ao BVDV-1 e 42,11% (40/95) de positivos ao VLEB .

Quanto a exploração de gado de corte, P5, 44,74% (34/76) dos animais de todo o rebanho foram positivos ao BoHV-1, 94,74% (72/76) positivos ao BVDV-1 e 3,95% (3/76) positivos ao VLEB.

O rebanho controle (P6), apesar de não apresentar animais positivos na triagem das amostras de soro testadas para o BoHV-1, ao examinar o soro de todo o rebanho, foi detectado 4,11% (3/73) de animais positivos ao BoHV-1, assim como 4,11% (3/73) para o BVDV-1 e 76,71% (56/73) positivos ao VLEB.

TABELA 2. Porcentagem (%) dos animais com reações positivas (R) na análise laboratorial da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina (LEB) junto com as médias geométricas (δ) dos títulos de anticorpos obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 e o BVDV-1, separados pelo tipo de exploração dos rebanhos

Propriedades	Tipo de exploração	N° de amostras analisadas	BoHV-1			BVDV-1			LEB	
			R	%	δ	R	%	δ	R	%
P1	Leite	31	26	83,87	179	14	45,16	70	19	61,29
P2	Leite	42	34	80,95	86	30	71,34	63	9	21,43
P3	Leite	34	27	79,41	123	5	14,71	25	25	73,53
Total (leite)		107	87	81,31	125	49	45,79	41	53	49,53
P4	Mista	95	31	32,63	25	73	76,84	63	40	42,11
P5	Corte	76	34	44,74	45	72	94,74	784	3	3,95
Sub-total		278	152	54,68	75	194	69,78	144	96	34,53
P6 (controle)	Leite	73	325	4,11	18	3	4,11	127	56	76,71
Total		351	242	44,16	68	197	56,13	94	152	43,30

Conforme mostra a tabela 3, das cinco propriedades selecionadas, três estavam localizadas no Estado de São Paulo, a P1 no município de Guariba, a P3 em São Carlos e a P4 em Pedregulho. As três propriedades juntas totalizaram 57,55% (160/278) das amostras originárias das propriedades selecionadas, exceto da propriedade controle. Das 160 amostras analisadas no Estado de São Paulo, foram positivas 52,5% (84/160) ao BoHV-1, 57,5% (92/160) ao BVDV-1 e, 52,5% (84/160) à LEB. As propriedades localizadas no Estado de Minas Gerais foram as P2 e P5, ambas pertencentes ao município de Poço Fundo. As duas propriedades totalizaram 42,45% (118/278) das amostras oriundas das propriedades selecionadas, exceto da propriedade controle. Foram positivas 66,10% (68/118) das amostras ao BoHV-1, 86,44% (102/118) ao BVDV-1 e 10,17% (12/118) ao VLEB.

TABELA 3. Porcentagem (%) de animais com reações positivas (R) na análise laboratorial de virusneutralização para o BoHV-1 e o BVDV-1 e da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzoótica bovina (LEB), separados pelo Estado de procedência das amostras

Estado	Propriedades	N° de amostras		BoHV-1		BVDV-1		LEB	
		analizadas	%	R	%	R	%	R	%
São Paulo	P1/Guariba	31	19,38	26	83,87	14	45,16	19	61,29
	P3/São Carlos	34	21,25	27	79,41	5	14,71	25	73,53
	P4/Pedregulho	95	59,38	31	32,63	73	76,84	40	42,11
Sub-total/ SP		160	57,55	84	52,5	92	57,5	84	52,5
Minas Gerais	P2/Poço Fundo	42	35,59	34	80,95	30	71,34	9	21,43
	P5/ Poço Fundo	76	64,41	34	44,74	72	94,74	3	3,95
Sub-total/ MG		118	42,45	68	66,10	102	86,44	12	10,17
Total		278	100	152	54,68	194	69,78	96	34,3

Na tabela 4, os resultados da análise estatística no teste do χ^2 sobre o BoHV-1 mostram que houve diferença significativa ($\alpha = 1$) tanto em relação a idade, quanto ao tipo de exploração pecuária da propriedade. No teste do desdobramento do χ^2 , os animais adultos foram os únicos que tiveram diferença estatística significativa e apresentaram ocorrência de 64,61% (115/178) de positividade ao BoHV-1, diferindo estatisticamente das outras faixas etárias que não diferiram entre si e cuja ocorrência, nos jovens foi de 36,92% (24/65) e nos bezerros foi de 37,14% (13/35). Quanto ao tipo de exploração, a leiteira foi diferente estatisticamente dos outros dois tipos ($\alpha = 1\%$), porém a mista e a de gado de corte não foram diferentes entre si; e a maior prevalência do BoHV-1 ocorreu nas propriedades de exploração leiteira, acometendo 81,31% (87/107) dos animais, seguida pela exploração de corte 44,74% (34/76), e por último a exploração mista 32,63% (31/95).

TABELA 4. Porcentagem (%) de animais com reação positiva na análise laboratorial de virusneutralização para o BoHV-1, separados pela faixa etária e tipo de exploração da propriedade

Enfermidade	Faixa etária	Amostras positivas/total	%
BoHV-1	Bezerros ^{a*}	13/35	37,14
	Jovens ^a	24/65	36,92
	Adultos ^b	115/178	64,61
	Tipo de exploração	Amostras positivas/total	%
	Corte ^{A**}	34/76	4,4
	Leite ^B	87/107	81,31
Mista ^A	31/95	32,63	

* letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($\alpha = 1$)

** letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($\alpha = 1$)

Na tabela 5, os resultados da análise estatística no teste do χ^2 sobre o BVDV-1 mostram que houve diferença significativa ($\alpha = 1$) tanto em relação à idade, quanto ao tipo de exploração pecuária da propriedade. No teste do desdobramento do χ^2 , os animais adultos foram os mais acometidos e apresentaram 74,16% (132/178) de positividade para o BVDV-1, não diferindo dos jovens, cuja ocorrência foi de 73,85% (48/65), porém essas duas faixas etárias diferem dos bezerros que apresentaram ocorrência de 40% (14/35). Em relação ao tipo de exploração, os três diferem significativamente entre si, e a prevalência encontrada para a exploração de gado de corte foi de 94,17% (72/76), seguida pela prevalência da mista que foi de 76,84% (73/95) e a menor prevalência observada 45,79% (49/107) foi para a exploração leiteira.

TABELA 5. Porcentagem (%) de animais com reações positivas na análise laboratorial de virusneutralização para o BVDV-1, separados pela faixa etária e tipo de exploração da propriedade

Enfermidade	Faixa etária	Amostras positivas/total	%
BVDV-1	Bezerros _{a*}	14/35	40,0
	Jovens _b	48/65	73,85
	Adultos _b	132/178	74,16
	Tipo de exploração	Amostras positivas/total	%
	Corte _{A**}	72/76	94,17
	Leite _B	49/107	45,79
	Mista _C	73/95	76,84

* letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($\alpha = 1$)

** letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($\alpha = 1$)

Na tabela 6, os resultados da análise estatística no teste do χ^2 para a LEB mostram que houve diferença significativa ($\alpha = 1$) tanto em relação à idade quanto ao tipo de exploração na detecção de anticorpos anti-VLEB. Para o tipo de exploração, não houve diferença estatística entre a exploração mista e leiteira, porém as duas diferem da exploração de gado de corte. A maior prevalência, 49,53% (53/107) foi observada na exploração de leite, 42,11% (40/95) na exploração mista e apenas 3,95% (3/76) para a exploração de corte. Em relação à faixa etária, todos os grupos diferem entre si, sendo os animais mais velhos os mais acometidos, com ocorrência de 45,51% (81/178), seguido dos jovens 23,08% (15/65) e por último os bezerros com 0% (0/35).

TABELA 6. Porcentagem (%) de animais com reação positiva na análise laboratorial de imunodifusão em gel de ágar para a LEB, separados pela faixa etária e tipo de exploração da propriedade

Enfermidade	Faixa etária	Amostras positivas/total	%
	Bezerros ^{a*}	0/35	0
	Jovens ^b	15/65	23,08
	Adultos ^c	81/178	45,51
LEB	Tipo de exploração	Amostras positivas/total	%
	Corte ^{A**}	3/76	3,95
	Leite ^B	53/107	49,53
	Mista ^B	40/95	42,11

* letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($\alpha = 1$)

** letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($\alpha = 1$)

Os resultados das análises das amostras das propriedades selecionadas, exceto da propriedade controle, apresentados na tabela 7, foram agrupados de acordo com o tipo de infecção acometida pelo animal. De 278 amostras, foram positivas apenas ao BoHV-1 6,12% (17/278), 21,94% (61/278) apenas ao BVDV-1, 1,44% (4/278) apenas para a LEB, 14,39% (40/278) as três viroses, 25,54% (71/278) tanto ao BoHV-1 quanto ao BVDV-1, 10,79% (30/278) ao BoHV-1 e a LEB, 7,91% (22/278) ao BVDV-1 e a LEB e apenas 11,87% (33/278) foram negativas a qualquer uma das enfermidades estudadas.

TABELA 7. Porcentagem (%) de animais com reação positiva (P) na análise laboratorial de virusneutralização para o BoHV-1 e o BVDV-1 e da imunodifusão em gel de ágar para a leucose enzootica bovina (LEB), tanto para uma enfermidade isolada ou em associação a outra, separados por propriedade

	Propriedades						Total	%
	P1	P2	P3	P4	P5	Total		
BoHV-1	1	6	5	4	1	17	6,12	
BVDV-1	0	0	0	24	37	61	21,94	
LEB	0	0	3	1	0	4	1,44	
Reagentes BoHV-1 e BVDV-1	6	21	0	12	32	71	25,54	
BoHV-1 e LEB	11	0	17	2	0	30	10,79	
BVDV-1 e LEB	0	1	0	20	1	22	7,91	
BoHV-1, BVDV-1 e LEB	8	8	5	17	2	40	14,39	
Positivos	26	36	30	80	73	245	88,13	
%	83,87	85,71	88,24	84,21	96,05	88,13		
Negativos	5	6	4	15	3	33	11,87	
Total	31	42	34	96	76	278	100	

Os dados obtidos na análise laboratorial de virusneutralização para o BoHV-1 e o BVDV-1 e da imunodifusão em gel de ágar para a LEB foram analisados estatisticamente pelo teste do χ^2 para verificar possível associação do BoHV-1 com as outras duas enfermidades virais. O resultado da análise estatística foi significativo ($\alpha = 5$) para a associação do BoHV-1 com o BVDV-1, e ($\alpha = 1$) do BoHV-1 com a LEB.

5. DISCUSSÃO

Em primeira instância, o presente trabalho mostrou a ocorrência de três enfermidades virais, a IBR, a BVD e a LEB, que estão disseminadas em grande parte do mundo. A ocorrência da IBR encontrada nesta pesquisa foi de 54,68%. Segundo estudos realizados por diversos autores, a prevalência do BoHV-1 no Brasil está entre 28,9% a 82,7% (GALVÃO et al., 1963; RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995; MOLNÁR et al., 2001; ROCHA et al., 2001).

No Estado de São Paulo a ocorrência foi de 52,5%, portanto muito próximo dos 53,9% obtidos por ALFIERI (2001). No Estado de Minas Gerais a ocorrência encontrada foi de 66,10%, que foi superior aos 58,2% encontrados por ROCHA et al. (2001) nesse mesmo Estado.

Em relação ao BVDV-1, a ocorrência encontrada de 69,78% está próxima dos 66,32% achados por QUINCOZES et al. (2007) e 61,47% por FIGUEIREDO et al. (1997), mas diferente dos 47,7% encontrados por PITUCO & DEL FAVA (1998). No Estado de São Paulo, a ocorrência desta enfermidade foi de 57,5%, valores também próximos aos 56,49% encontrados por SAMARA et al. (2004); e no Estado de Minas Gerais foi de 86,44%, índice bem maior que os 57,56% que SAMARA et al. (2004) encontraram no mesmo Estado.

Neste trabalho a ocorrência geral da LEB foi de 34,53%. Para o Estado de Minas Gerais, a ocorrência foi de 10,17% e no Estado de São Paulo de 52,5%, este último, resultados semelhantes aos obtidos por MEGID et al. (2003) de 47,4%. A prevalência da LEB no Brasil também varia muito, do mínimo, 9,2% encontrada por MORAES et al. (1996) no Estado do Rio Grande do Sul, até o máximo de 70,9% no Estado de Minas Gerais (LEITE et al., 1984).

A análise estatística referente ao BoHV-1 mostrou que os animais adultos e o tipo de exploração leiteira foram os mais acometidos. As prováveis causas desses resultados devem ao fato dos animais destinados a esse tipo de exploração possuir uma maior longevidade e manejo mais intensivo que os outros dois tipos. Além disso,

neste tipo de exploração, o manejo adotado na criação de bezerros permite que os adultos fiquem separados por mais tempo dos animais mais jovens.

Segundo BOELAERT et al. (2005), dois fatores favorecem a infecção do BoHV-1 nos animais mais velhos. Primeiro é que animais com idade mais avançada têm maior probabilidade de contato com o vírus (BOELAERT et al., 2005; BARBOSA et al., 2005). O segundo fator pode estar relacionado ao manejo intensivo, o que ocasiona um maior estresse no animal (BOELAERT et al., 2005). O estresse promove uma liberação do vírus latente, ocasionando uma viremia, que pode resultar em excreção do vírus para o meio ambiente, conseqüentemente ficando livre para infectar outros animais suscetíveis (LEMAIRE et al., 1994).

O resultado da análise estatística relacionada ao BVDV-1 com o tipo de exploração da propriedade também foi significativo. No presente estudo, os rebanhos leiteiros, misto e de gado de corte, foram diferentes entre si, sendo a maior prevalência para a exploração de corte (94,74%), seguida pela mista (76,84%) e a menos acometida foi a exploração leiteira (45,79%). Esses dados divergem dos resultados obtidos por QUINCOZES et al. (2007) onde o tipo de exploração mais acometido foi a mista, seguida pela corte e a menos acometida foi a leiteira. Em relação a idade, se retirarmos a faixa etária denominada por bezerros, que compreende animais de 0 a 8 meses de idade, com possível interferência de anticorpos de origem colostrar, a faixa etária não é um fator de risco para esta enfermidade. Estes dados corroboram com os resultados obtidos por QUINCOZES et al. (2007), que não obteve em seu estudo diferença significativa em relação à idade, porém divergem dos resultados encontrados por MAINAR-JAIME et al. (2001) que encontraram um maior acometimento do BVDV-1 nos animais adultos.

Relacionando os resultados da LEB com a faixa etária dos animais e o tipo de exploração das propriedades, houve diferença significativa para ambas as análises. A maior prevalência, 49,53 (53/107) foi observada na exploração de leite, 42,11% (40/95) na exploração mista e apenas 3,95% (3/76) para a exploração de carne. Em relação a faixa etária, todos os grupos diferem entre si significativamente, sendo os animais mais velhos os mais acometidos.

Os resultados obtidos, neste trabalho, em relação à LEB estão de acordo com a literatura pertinente, na qual os animais mais velhos e os pertencentes às propriedades de exploração leiteira são os mais acometidos por essa enfermidade. Segundo DUS SANTOS et al. (2007), o principal meio de transmissão da LEB é pela forma iatrogênica, por meio do manejo, como, por exemplo, a vacinação sem troca de agulha e a palpação de vários animais com a mesma luva. Também pelo fato da LEB ser uma enfermidade de infecção crônica acomete com maior frequência os animais mais velhos (TRAININ et al., 1996).

Na associação das enfermidades, o maior índice foi de 25,54% para o BoHV-1 com o BVDV, 21,94% para o BVDV-1 sozinho; seguido dos 14,39% para as três enfermidades; 11,87% para nenhuma doença; 10,79% para o BoHV-1 com a LEB; 7,91% para o BVDV-1 com a LEB; 6,12% para o BoHV-1 sozinho e 1,44% apenas para a LEB. Vale lembrar que esses resultados foram obtidos ao analisar amostras de sangue provenientes de animais que não foram vacinados.

A possível associação do BoHV-1 com o BVDV-1 e do BoHV-1 com a LEB foi estatisticamente significativa. Apesar de ter encontrado uma maior incidência de animais acometidos pela associação do BoHV-1 com o BVDV-1 (25,54%), do que pelo BoHV-1 com a LEB (10,79%), a diferença estatística foi significativamente maior para a associação do BoHV-1 com a LEB ($\alpha = 1\%$) do que do BoHV-1 com o BVDV-1 ($\alpha = 5\%$). Os resultados sugerem que propriedades onde há animais com uma das duas enfermidades, seja ela BDV ou LEB, a probabilidade de ocorrer a IBR é maior do que em propriedades onde as outras duas enfermidades não ocorrem. Este fato pode ser explicado, pois tanto a BDV quanto a LEB são enfermidades que causam imunossupressão no animal.

A imunossupressão causada pelo BVDV ocorre por uma diminuição na resposta de memória dos linfócitos a outros patógenos; independente de ser uma infecção aguda ou branda; com isso, a patogenicidade dos outros microrganismos aumenta (LAMONTAGNE et al., 1989; HOLLAND et al.; 1993). Animais acometidos pela LEB produzem uma menor quantidade de IgM no soro, além de produzirem anticorpos

inespecíficos, indicando uma possível deficiência na produção dos anticorpos (TRAININ et al., 1996).

Na infecção pelo BoHV-1, o vírus consegue migrar até os linfonodos onde fica em latência. O animal então torna-se portador e potencial transmissor desta enfermidade para o resto de sua vida (LEMAIRE et al., 1994; MUYLKENS et al., 2007). O vírus em latência pode apresentar subseqüentes e intermitentes episódios de re-excreção viral, podendo ou não ser acompanhados de sinais clínicos (FENNER et al., 1993). A re-excreção pode ocorrer quando o animal passa por um estresse. Este promove a liberação do vírus latente, causando viremia, com uma possível excreção viral (LEMAIRE et al., 1994). O que determina a ocorrência ou não a re-excreção é o estado imune do animal. Caso o animal tenha quantidade suficiente de anticorpos para debelar o vírus que está presente na circulação, não ocorrerá a excreção viral; porém se a quantidade de anticorpos é insuficiente, o vírus, presente na circulação do animal, será excretado para o ambiente podendo infectar outros animais suscetíveis (LEMAIRE et al., 1994).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

- os três vírus pesquisados estão difundidos nas regiões dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, tendo o BVDV-1 a maior prevalência (69,78%), seguido do BoHV-1 (54,68%) e com menor prevalência o VLEB (34,53%).
- a probabilidade de infecção pelo BoHV-1 foi maior quando os animais estavam infectados também pelo VBVD ou pelo VLEB.
- os animais adultos foram os mais acometidos por todas as enfermidades pesquisadas.
- os animais das propriedades de exploração leiteira foram os mais acometidos pelo BoHV-1 e pelo VLEB.
- os animais das propriedade de exploração de corte foram os mais acometidos pelo BVDV e os menos acometidos para a LEB
- A propriedade de exploração mista apresentou prevalência mediana de BVD e LEB em relação aos outros tipos de exploração, sendo a menos acometida pelo BoHV-1.

7. REFERÊNCIA

ACKERMANN, M.; BELAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 361-363, 1990a.

ACKERMANN, M.; Muller, H. K.; Bruchner, L.; Kihm, U. Erradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 365-370, 1990b.

ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C. Conseqüências da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 19, n. 1, p. 86-93, 1998.

AMORIL, J. G. **Leucose enzoótica bovina: epidemiologia e diagnóstico em animais abatidos no Estado de Goiás**. 2005, 161f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, 2005.

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.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7^a edição, p. 1263, 1991.

BOELAERT, F.; SPEYBROEC, N.; KRUIFK, A.; AERTS, M.; BURZYKOWSKY, T.; MOLENBERGHS, G.; BERKVEN, D. L. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 69, p. 285-295, 2005.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. The clinical significance of genetic variation among bovine viral diarrhoea viruses. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 10, p. 958-961, 1996.

BÖTTCHER, J.; GOTTSCHALK, E.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V.; BOMMELI, W.; LIESS, B. Diagnosis of bovine virus diarrhoea by two enzyme-linked immunosorbent assays. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 12, n. 2, p. 461-469, 1993.

BROCK, K. V. Diagnosis of Bovine Viral Diarrhoea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 549-561, 1995.

CARLI, K. T.; BATMAZ, A.; SEN, A.; MINBAY, A. Comparison of serum, milk and urine as samples in an enzyme immunoassay for bovine leukaemia virus infection. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 394-395, 1993.

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.

D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, T. C.; FRANCO, A. C.; SPILKI, F.; ROECHE, P. M.; ARNS, C. W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody

analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 315-324, 2002.

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

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Rev. Educ. contin. CRMV- SP/ Continuous Education Journal CRMV-SP**, São Paulo, v. 5, fascículo 3, p. 300-312, 2002.

DONATE, J.; MAZZUCHELLI, F. Actualización en diarrea vírica bovina. **Medicina Veterinária**, Barcelona, v. 12, n. 9, p. 486-500, 1995.

DUBOVI, E. J. Bovine viral diarrhea virus. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVIRUS BOVINO E VIRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. **Anais...** p. 1-19.

DUS SANTOS, M. J.; TRONO, K.; LAGER, I.; WIGDOROVITZ, A. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 10-18, 2007.

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 213-223, 1990.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

FENNER, F. **Veterinary virology**. 1st ed. Londres: Academic Press, p. 445, 1987.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. Herpesviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 2 ed. New York: Academic Press, p. 335-368, 1993.

FENNER, F. J.; McAUSLAN, B. R.; MIMS, C. A.; SAMBROOK, J.; WHITE, D. O. Herpesviridae. In: _____. **The biology of animal viruses**. 2.ed. New York: academic Press, p. 41-146, 1974.

FERRER, J. F. Bovine lymphosarcoma. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, New York, v. 24, p. 1-68, 1980.

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 - Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 4, p. 11-15, 1997.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; GIL, L. H. V. G. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, Amsterdam, v. 87, p. 51-60, 2003.

FRAY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 61, p. 615-627, 2000.

GALVÃO, C.; DORIA, J. D.; ALICE, F. J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em bovinos do Brasil. **Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v. 1, n. 6, p. 15-25, 1963.

GARCIA, M.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J. Avaliação do leucograma de fêmeas da raça holandesa naturalmente infectadas pelo vírus da Leucose Bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 11, p.61-64, 1991.

GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005.

HOLLAND, R. E.; BEZEK, D. M.; SPRECHER, D. J.; PATTERSON, J. S.; STEFICEK, B. A.; TRAPP, A. L. Investigation of an epizootic of bovine viral diarrhea virus infection in calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 202, n. 11, p. 1.849-1.854, 1993.

HOUE, H. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 521-547, 1995.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 62, n. 4, p. 287-312, 1992.

KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 171, n. 10, p. 1055-1064, 1997.

KAHRS, R. F., SMITH, R. S. Infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis, and abortion in a New York Dairy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 146, p. 217-220, 1965.

KRAHL, M.; BRAGA, A. C.; OLIVEIRA, L. G.; NETO, J. A. S. P.; PRADO, J. A. P.; ROSA, J. C. A.; WUNDER JÚNIOR, E. Pesquisa de anticorpos para leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA**

VETERINÁRIA, 25., 1997, Gramado. *Anais...* Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997. p. 174.

KRAMPS, J. A.; MAANEN, C. V.; WETERING, G. V.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 135-144, 1999.

LAMONTAGNE, L.; LAFORTUNE, P.; FOURNEL, M. Modulation of the cellular immune responses to T-cell-independent antigens in lambs with induced bovine viral diarrhoea virus infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 1604-1608, 1989.

LARSON, B. L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 4-6, p. 478-486, 1996.

LEITE, R. C.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C.; ABREU, J. J. Evolução clínica da Leucose Enzoótica Bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 47-57, 1984.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; TRIRY, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, Bruxelles, v. 138, p. 167-180, 1994

LICURSE, M.; INOSHIMA, Y.; WU, D.; YOKOYAMA, T.; GONZALÉZ, E. T.; SENTSUI, H. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 17-23, 2003.

LOVATO, L. T.; WEIBLEM, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.

MADIN, S. H.; YORK, C. J.; McKERCHER, D. G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis vírus. **Science**, Washington, v. 124, n. 3223, p. 721-722, 1956.

MAINAR-JAIME, R. C.; BERZAL-HERRANZ, B.; ARIAS, P.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea vírus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 52, p. 63-73, 2001.

MASRI S. A.; OLSON, W.; NGUYEN, P. T.; PRIN, S.; DEREGT, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 60, p. 100-107, 1996.

McKERCHER, D. G.; WADA, E. M. The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 144, n. 10, p. 136-142, 1964.

MECHAM, J. O. et al. Report of the Committee on bluetongue and bovine retrovirus. In: UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 2000 Committee Reports, 2000, Birmingham. **Reports...** Disponível em: <<http://www.usaha.org/reports/reports00/r00btbrv.html>> Acesso em: 30 ago 2005.

MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; KURODA, R. B. S.; CRUZ, T. F.; LIMA, K. C. Ocorrência de Leucose Enzoótica Bovina na Microrregião da Serra de Botucatu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 645-646, 2003.

MILLER, J. M.; VAN DER MATTEN, M. J. Effect of primary and recurrent infectious bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 7, p. 1434-1437, 1985.

MILLER, J. L.; WHETSTONE, C. A.; VAN DER MAATTEN, M. J. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n.3, p. 458-461, 1991.

MOLES, C. L. P.; GAVALDÓN, D.; TORRES, B. J.; CISNEROS, P. M. A.; AGUIRRE, S. J.; ROJAS, S. N. Seroprevalencia simultánea de leptospirosis y tres enfermedades de importancia reproductiva en bovinos del altiplano central dela República Mexicana. **Rev. Salud Anim.** v. 24, n. 2, p. 106-110, 2002.

MOLNÁR, E.; CAMELO, A. S. A.; SILVA, E. B.; MOLNÁR, L. Prevalência da infecção pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em bubalinos e bovinos no estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, 2001.

MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; OLIVEIRA, J. C. D.; REBELATTO, M. C.; ZANINI, M. R.; HÜBNER, S. O.; PEREIRA, N. M. Levantamento sorológico da infecção pelo Vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 257-262, 1996.

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

MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; CAMPOS, M. T. G. R.; RIBEIRO, L. O. C. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto bovino (IBR/IPV). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 187-190, 1978.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 38, p. 181-209, 2007.

OIE. Office Internatinal des Épizooties. Manual of standards for diagnostic test and vacines. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00132.htm. Acesso em 20 jun 2005.

PARODI, A. L. Pathology of Enzootic Bovine Leukosis. Comparison with the sporadic form. In: BURNY, A. & MAMMERICKX, M. (Eds.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, p.15-49, 1987.

PELLEGRIN, C.; VAN DER HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, New York, v. 203, p. 260-268, 1994.

PELZER, K. D. 1997. Economics of Bovine Leukemia Virus Infection. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Praticce**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 129-141, 1997.

PHILPOTT, M. The dangers of disease trasmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, London, v. 149, n. 4, p. 339-369, 1993.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA**, 1998, Santa Maria. *Anais ...* p. 49-57.

POTGIETER, L. N. D. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 471-481, 1997.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. A.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalence and factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in South of Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

RAVAZZOLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 17, p. 89-95, 1989.

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

RIET-CORREA, F. et al. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.

ROCHA, M. A. Diagnóstico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 535-539, 1999.

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.

RIDPATH, J. F. **Classification and molecular biology**. IN: GOYAL, S.M. & RIDPATH, J.F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 3, p. 65-80.

SAMARA, S. I.; LIMA, E. G.; NASCIMENTO, A. A. Monitoração da Leucose Enzoótica Bovina no gado leiteiro da região de Pitangueiras/SP. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 6, 349-351, 1997.

SAMARA, S. I.; DAIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G.; BUZINARO, M. G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 75-82, 2004.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpes viruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, p. 17-29, 1996.

SOLIS-CALDERON, J. J.; CORREA, V. M. S.; CORREA, J. C. S. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, p. 253-262, 2005.

STRAUB, O. C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

STRAUB, O. C. Natural and experimental transmission of bovine leukemia virus. In: BURNY< A>: MAMMERICKX<M> (Ed) **Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus**. Boston: Martinus Nijhoff Publishing, p. 229-249, 1987.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. A bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. In: **MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F.A.; SHANTKIN, A.J. Advances in virus research**. San Diego: Academic Press, v. 45, p. 191-223, 1995.

TIMONEY, P. J. An outbreak of the conjunctival form of infectious bovine rhinotraqueitis virus infection. **Veterinary Record**, London, v. 89, p. 370, 1971.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; STRYHN, H.; KEEF, G. P.; HADDAD J. P. Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, p. 01-12, 2005.

TOSTES, R. A. Situação da leucose bovina no Brasil: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, n.1, p. 42-50, 2005.

TRAININ, Z.; BRENNER, J. The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Rishon Le-Zion, v. 60, n. 4, p. 94-105, 2005.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M. Bovine leukosis virus. In: DINTER,Z.; MOREIN, B. **Virus infections of ruminants**, Amsterdam: Elsevier, chapter 39, p. 419-429, 1990.

VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A. M. Advances in development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 43-54, 1996.

VAN SCHAIK, G.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A. A.; BARKEMA, H. W.; DENEDICTUS, G. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 54, n. x, p. 279-289, 2002.

VAN SCHAIK, G.; DIJKHUIZEN, A. A.; HUIRNE, R. B. M.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; HAGE, J. J. Risk factors for existence of bovine herpesvirus 1 antibodies on non-vaccinating Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 34, p. 125-136, 1998.

VIDOR, T.; HAEFEN, D. C.; LEITE, T. E.; COSWIG, L. T. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 421-424, 1995.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B. et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 99-115, 2001.

VONK NOORDEGRAAF, A.; LABROVIC, A.; FRANKENA, K.; PFEIFFER, D. U. NIELEN, M. Simulated hazards of losing infection-free status in a Dutch BHV1 model. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 51-58, 2004.

WALDNER, C. L. Serological status for *N. Caninum*, bovine viral diarrhoea, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 90, n. 3-4, p. 219-242, 2005.

WHITE, M. B., SNOWDON, W. A. The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with infectious bvine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 49, p. 501-506, 1973.

WILSON, T. E. Observations and comments on two outbreaks of abortion associated with IBR virus infection. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 15, p. 227-229, 1974.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

APÊNDICE

A seguir estão apresentadas as planilhas individuais das 10 propriedades rurais utilizadas na triagem, com os dados de identificação dos animais e os resultados qualitativos dos testes de VN para IBR.

Propriedade 1

Localização: Guariba – SP

Nº total de bovinos na propriedade: 32

Raça: mestiço

Regime e criação: extensivo

Tipo de exploração: leiteira

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	R*
2	adulta	R
3	adulta	R
4	adulta	R
5	adulta	R
6	8 – 18 meses	R
7	8 – 18 meses	R
8	8 – 18 meses	R
9	8 – 18 meses	R
10	8 – 18 meses	R

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

- animais reagentes

Propriedade 2**Localização: Poço Fundo – MG****Nº total de bovinos na propriedade: 100****Raça: mestiço****Regime e criação: extensivo****Tipo de exploração: leite**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	R*
2	adulta	R
3	adulta	R
4	adulta	R
5	adulta	R
6	8 – 18 meses	NR [#]
7	8 – 18 meses	NR
8	8 – 18 meses	NR
9	8 – 18 meses	NR
10	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

• animais reagentes

Propriedade 3**Localização: São Carlos – SP****Nº total de bovinos na propriedade: 58****Raça: mestiço****Regime e criação: extensivo****Tipo de exploração: leiteira**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	NR [#]
2	adulta	R*
3	adulta	R
4	adulta	NR
5	adulta	NR
6	8 – 18 meses	NR
7	8 – 18 meses	R
8	8 – 18 meses	NR
9	8 – 18 meses	NR
10	8 – 18 meses	R

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

• animais reagentes

Propriedade 4**Localização: Pedregulho - SP****Nº total de bovinos na propriedade: 90****Raça: holandês preto e branco PO e mestiço: gir e nelore****Regime e criação: extensivo**

Tipo de exploração: mista (leite, corte)Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	R*
2	adulta	NR#
3	adulta	NR
4	adulta	R
5	adulta	NR
6	8 – 18 meses	NR
7	8 – 18 meses	NR
8	8 – 18 meses	NR
9	8 – 18 meses	NR
10	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

• animais reagentes

Propriedade 5**Localização: Poço Fundo – MG****Nº total de bovinos na propriedade: 70****Raça: mestiço****Regime e criação: extensivo****Tipo de exploração: corte**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	NR#
2	adulta	NR
3	adulta	R*
4	adulta	R
5	adulta	R
6	8 – 18 meses	NR
7	8 – 18 meses	R
8	8 – 18 meses	R
9	8 – 18 meses	R
10	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

• animais reagentes

Propriedade 6**Localização: Jaboticabal - SP****Nº total de bovinos na propriedade: 80****Raça: holandês preto e branco****Regime e criação: extensivo****Tipo de exploração: leiteira**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	NR [#]
2	adulta	NR
3	adulta	NR
4	adulta	NR
5	adulta	NR
6	adulta	NR
7	adulta	NR
8	adulta	NR
9	adulta	NR
10	adulta	NR
11	adulta	NR
12	adulta	NR
13	adulta	NR
14	adulta	NR
15	adulta	NR
16	8 – 18 meses	NR
17	8 – 18 meses	NR
18	8 – 18 meses	NR
19	8 – 18 meses	NR
20	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

Propriedade 7**Localização: Machado, MG****Nº de bovinos na propriedade: 335****Raça: holandês preto e branco PO****Regime e criação: Intensivo (free-stall)****Tipo de exploração: leiteira**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	NR [#]
2	adulta	NR
3	adulta	NR
4	adulta	NR
5	adulta	NR
6	8 – 18 meses	NR
7	8 – 18 meses	NR
8	8 – 18 meses	NR
9	8 – 18 meses	NR
10	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

Propriedade 8**Localização: São Carlos - SP****Nº de bovinos na propriedade: 65****Raça: holandês preto e branco****Regime e criação: Extensivo****Tipo de exploração: leiteira**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	NR [#]
2	adulta	NR
3	adulta	NR
4	adulta	NR
5	adulta	NR
6	8 – 18 meses	NR
7	8 – 18 meses	NR
8	8 – 18 meses	NR
9	8 – 18 meses	NR
10	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

Propriedade 9**Localização: São Gonçalo do Sapucaí - MG****Nº de bovinos na propriedade: 750****Raça: holandês preto e branco (50%) e girolando (50%)****Regime e criação: Semi-intensivo****Tipo de exploração: leiteira**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	RN [#]
2	Adulta	R [•]
3	Adulta	NR
4	Adulta	R
5	Adulta	R
6	Adulta	NR
7	Adulta	R
8	Adulta	R
9	Adulta	NR
10	Adulta	R
11	Adulta	R
12	Adulta	R
13	Adulta	NR
14	Adulta	R
15	Adulta	R
16	8 – 18 meses	NR
17	8 – 18 meses	NR
18	8 – 18 meses	NR
19	8 – 18 meses	NR
20	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

• animais reagentes

Propriedade 10**Localização: São José do Rio Preto – SP****Nº total de bovinos na propriedade: 150****Raça: Mestiço****Regime e criação: extensivo****Tipo de exploração: corte**

Nº ORDEM	IDADE	IBR
1	adulta*	NR#
2	adulta	R•
3	adulta	NR
4	adulta	R
5	adulta	NR
6	8 – 18 meses	NR
7	8 – 18 meses	NR
8	8 – 18 meses	NR
9	8 – 18 meses	NR
10	8 – 18 meses	NR

*são considerados animais adultos aqueles com idade igual ou superior a 24 meses

animais não reagentes

• animais reagentes