

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL  
BOVINA (BVD) NO SORO SANGÜÍNEO, NO LEITE INDIVIDUAL E NO  
LEITE DE CONJUNTO EM TANQUE DE EXPANSÃO DE REBANHOS NÃO  
VACINADOS

FABIO CARVALHO DIAS  
Médico Veterinário

Orientador: Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

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

Jaboticabal - SP  
2001

Dias, Fabio Carvalho

D541d Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVD) no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanho não vacinados / Fabio Carvalho Dias. -- Jaboticabal, 2001  
xvii, 108 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001

Orientador: Samir Issa Samara

Banca examinadora: Luís Antônio Mathias, Amauri Alcindo Alfieri

Bibliografia

1. Diarreia viral bovina. 2. Anticorpos. 3. Leite. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.934:636.2

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVD) NO SORO SANGÜÍNEO, NO LEITE INDIVIDUAL E NO LEITE DE CONJUNTO EM TANQUE DE EXPANSÃO DE REBANHOS NÃO VACINADOS.

**AUTOR:** **FABIO CARVALHO DIAS**

**ORIENTADOR:** **Dr. SAMIR ISSA SAMARA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA) pela Comissão Examinadora:

**Dr. SAMIR ISSA SAMARA**

**Dr. LUIS ANTÔNIO MATHIAS**

**Dr. AMAURI ALCINDO ALFIERI**

Data da realização: 24 de setembro de 2001.

Presidente da Comissão Examinadora  
**Dr. SAMIR ISSA SAMARA**

**APOIO FINANCEIRO**

FAPESP

Bolsa de Mestrado - processo nº 99/04822-6

## DEDICO

À minha mãe *Inelma*, pelo incentivo constante para que eu retornasse à Faculdade e continuasse meus estudos, e mais uma vez ela estava certa...

Ao meu pai *Lindolfo*, meus irmãos *Myrna*, *Eduardo* e *Érika* e às minhas sobrinhas *Paula*, *Laura* e *Clara*.

*"A minha família é o que tenho de mais precioso na vida"*

Às minhas avós *Ernestina* e *Georgeta*, que para sempre estarão presentes na minha vida.

*Muitas saudades...*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus Trino:*

*Pai, pela proteção contínua,*

*Filho, pelo amor de seu Sagrado Coração,*

*Espírito Santo, pela inspiração e por sempre trilhar meus caminhos.*

*" Não te irrites por causa dos que agem mal,  
Nem invejes aos que praticam a iniquidade,  
Pois logo eles serão ceifados como a erva dos campos,  
E como a erva verde murcharão.  
Espera no Senhor e faze o bem;  
Habitarás a terra em plena segurança.  
Põe tuas delícias no Senhor,  
E os desejos do teu coração ele atenderá.  
Confia ao Senhor a tua sorte,  
Espera Nele: e Ele agirá.  
Como a luz, fará brilhar a tua justiça,  
E como o sol do meio-dia o teu direito.  
Em silêncio, abandona-te ao Senhor,  
Põe tua esperança Nele. "*

SALMO 36 (1-7) - A certeza da felicidade dos justos

À Virgem Maria,

Mãe de Deus e Nossa Mãe, que sempre está presente ao meu lado, em qualquer circunstância de minha vida, cobrindo-me com seu manto sagrado.

*“ Queridos filhos! Hoje convido todos vocês a decidirem pela santidade. Que para vocês, filhinhos, a santidade esteja sempre em primeiro lugar em seus pensamentos e em cada situação, no trabalho e nas suas palavras. Dessa forma, vocês a colocarão em prática, pouco a pouco e, passo a passo, a oração e a decisão pela santidade entrarão em sua família. Sejam verdadeiros com vocês mesmos e não se atenham às coisas materiais, mas sim a Deus. E não se esqueçam, filhinhos, de que a vida de vocês é passageira como uma flor. Obrigada por terem respondido ao meu chamado.”*

Mensagem mensal (25/08/01) de Nossa Senhora “ Rainha da Paz ”

Medjugorje, Bósnia-Herzegovina

Ao Prof. Dr. Samir Issa Samara, por ter aceito orientar-me, pela confiança depositada para o início da linha de pesquisa em BVD, pelo respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Mathias, pelas sugestões no desenvolvimento do trabalho e pela colaboração na qualificação e na defesa.

Ao Prof. Dr. Amauri Alfieri, pela disponibilidade, atenção e colaboração na defesa.

À Sandra Gatti, uma verdadeira e querida amiga, que sempre me ajudou, principalmente nos últimos meses que antecederam a defesa.

À Maria Imaculada Fonseca, amiga fiel e presente, que também muito me ajudou nos últimos meses que antecederam a defesa.

À Walquíria Almeida, Larissa Tolfo, Cláudia Angelotti e Nilce Gama pela amizade sincera, atenciosa e carinhosa.

À Andréa Souza Medeiros, mais que uma colega de trabalho, e sim uma amiga.

Aos amigos Alessandra Fernandes, Brenda Luquetti, Luciano Melo e a todos que realmente fazem parte de uma grande família que tenho em Jaboticabal.

Às Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Adolorata Carvalho Bianco e Maria da Glória Buzinaro e à técnica Maria Aparecida Tostes, pela amizade e atenção.

À D. Adelina e Sr. Milton, pela atenção sempre prestada.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo excelente convívio.

Aos médicos veterinários Rosália Maciel, Roberto Moreira, Fernando Caixeta, Alexandre Tavares, Carlos Alberto Gouveia e Maria Alice Campos e aos agrônomos Ricardo Signoretti e Alessandra, pela ajuda na indicação e seleção das propriedades para a pesquisa.

Aos proprietários que permitiram a utilização de seus animais, bem como a alteração na rotina da propriedade.

Aos companheiros de república, principalmente Gustavo Figueiredo, por uma convivência amigável e harmoniosa.

À Tiekó e aos demais funcionários da biblioteca, por serem sempre atenciosos.

Às funcionárias do restaurante universitário, pela atenção e privilégios.

À D. Jandyra, por novamente cuidar de minha roupa.

À Helynis Faria Nunes e Wilson Gambogi Filho, pela ajuda na fase final do mestrado, em que estive em Passos.

Aos amigos do Grupo de Oração Universitário Magnificat.

**SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1 RESUMO.....	1
2 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3 OBJETIVOS.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Caracterização das populações estudadas.....	43
4.2 Colheita das amostras.....	44
4.2.1 Soro sanguíneo.....	45
4.2.2 Leite.....	45
4.2.2.1 Amostra individual.....	45
4.2.2.2 Amostra de conjunto.....	46
4.3 Teste sorológico.....	46
4.3.1 “kit” de ELISA.....	47
4.3.2 Preparação das amostras e reagentes.....	48
4.3.3 Manipulação das amostras e controles.....	51
4.3.3.1 Características de diluição das amostras de soro sanguíneo e controles.....	51
4.3.3.2 Características de diluição das amostras de leite.....	51
4.3.4 1ª lavagem de placas.....	52
4.3.5 Adição do conjugado.....	53
4.3.6 Adição do substrato.....	53
4.3.7 Adição da solução “stopping” e leitura dos resultados.....	53
4.3.8 Interpretação dos resultados.....	54
4.4 Análise estatística.....	56
5 RESULTADOS.....	58
6 DISCUSSÃO.....	84
7 CONCLUSÕES.....	96
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
9 ABSTRACT.....	107



**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1: Representação gráfica das percentagens do total de amostras de soro sangüíneo e leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD em todas as propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	66
Figura 2: Representação gráfica das percentagens de amostras de soro sangüíneo positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	69
Figura 3: Representação gráfica das percentagens de amostras de leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	71

## LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Esquema para cálculo do teste exato de Fischer, utilizando uma tabela de contingência do tipo 3X3, confrontando-se as variáveis negativa, suspeita e positiva (escores 0, 1 e 2, respectivamente) quanto à presença de anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de soro sangüíneo e leite individual de vacas provenientes das diferentes propriedades estudadas no período de março a junho de 2000.....	57

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Localização das diferentes propriedades selecionadas para o estudo e número de animais analisados por rebanho onde foram colhidas as amostras de leite e soro sangüíneo no período de março a junho de 2000.....	49
Tabela 2: Número de animais analisados para a pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD no leite e soro sangüíneo, de acordo com as regiões estudadas no período de março a junho de 2000.....	49
Tabela 3: Número de amostras de soro sangüíneo, de leite individual e de leite de conjunto do tanque de expansão colhidas nas diferentes propriedades no período de março a junho de 2000.....	50

Tabela 4: Características das propriedades e dos rebanhos, bem como os cuidados com a sanidade, presença de alterações reprodutivas e sintomatologia sugestiva de BVD nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	63
Tabela 5: Número e percentagem de amostras de soro sanguíneo positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	64
Tabela 6: Número e percentagem de amostras de leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	65
Tabela 7: Número e percentagem de animais reagentes no soro sanguíneo, no leite individual e percentagem de animais reagentes concordantes no soro sanguíneo e no leite individual submetidos ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD, assim como a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão, nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	67
Tabela 8: Número e percentagem de amostras de soro sanguíneo positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000.....	68

- Tabela 9: Número e porcentagem de amostras de leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000..... 70
- Tabela 10: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 1, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 72
- Tabela 11: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 2, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 73
- Tabela 12: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 3, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 74
- Tabela 13: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 4, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 75

- Tabela 14: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 5, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 76
- Tabela 15: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 6, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 77
- Tabela 16: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 7, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 78
- Tabela 17: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 8, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 79
- Tabela 18: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 9, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 80
- Tabela 19: Valores de DO das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 10, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD... 81

- Tabela 20: Valores de DO e resultado final do teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de leite de conjunto das diferentes propriedades, colhidas no tanque de expansão ou obtidas a partir da mistura homogênea, entre os meses de março e junho de 2000.... 82
- Tabela 21: Resultados das análises estatísticas aplicadas aos dados obtidos com as amostras de cada propriedade, bem como de todas as propriedades agrupadas, por meio do teste exato de Fischer e coeficiente de associação de Spearman para verificação da correlação entre anticorpos presentes no soro sanguíneo e leite individual das amostras colhidas nas diferentes propriedades no período de março a junho de 2000..... 83

## 1 RESUMO

Pela pesquisa de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina (BVD), utilizando o teste de ELISA indireto, foi estudada a correlação existente entre a proporção de vacas lactantes e a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão. Para isso foram analisadas amostras de soro sangüíneo e de leite individual de 376 vacas lactantes não vacinadas, provenientes de 10 propriedades localizadas nas regiões Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo, assim como uma amostra do leite do tanque de expansão de cada rebanho. Em todas as propriedades foram encontradas vacas reagentes no soro sangüíneo, cuja freqüência variou de 12,28 a 100,00%. Já a análise do leite individual não revelou animais reagentes em duas propriedades, e nas demais a freqüência variou de 5,26 a 70,83%. Foram detectados anticorpos no leite do tanque de expansão das propriedades cuja proporção de soros sangüíneos reagentes foi igual a ou maior que 82,86%, e cuja proporção de leites individuais reagentes foi igual a ou maior que 32,14%.

## 2 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Qualquer processo produtivo visa obter um produto de excelente qualidade num menor espaço de tempo. Esse conceito também é aplicado à pecuária bovina, no caso específico de rebanhos leiteiros, em que são esperadas fêmeas em produção o mais cedo possível e que permaneçam eficientes para a produção e a reprodução. Da mesma forma, em rebanhos de corte são esperados animais com ótimo desenvolvimento e em ponto de abate num curto período, além de uma excelente eficiência das matrizes para reposição do plantel.

Para obter esses animais é necessário que vários fatores estejam interligados, tais como tecnologias de produção, aprimoramento genético do rebanho, nutrição correta e cuidados com a sanidade animal. Esses fatores são muito bem aceitos pelos criadores, excetuando porém a sanidade animal, em que existe uma certa negligência por parte daqueles que são os responsáveis, criadores e médicos veterinários. Aos criadores compete somente a falsa idéia de cumprir as obrigações impostas pelo Estado, como é o caso da vacinação contra a febre aftosa, e aos médicos veterinários falta muitas vezes o aprimoramento dos conhecimentos e a atualização das informações. É neste ponto que entra a negligência e falta de atenção com muitas enfermidades que estão presentes nos rebanhos bovinos brasileiros, tais como a leucose enzoótica bovina, infecções por *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, rinotraqueíte infecciosa dos bovinos e particularmente a diarréia viral bovina (BVD).



A BVD está distribuída nos rebanhos bovinos de todo o mundo, comprometendo o desempenho reprodutivo e produtivo dos animais e gerando perdas que muitas vezes são atribuídas a outras infecções. No Brasil a enfermidade é pouco conhecida entre os criadores, e até mesmo por alguns médicos veterinários. Alguns questionam se ela realmente existe, se está presente no nosso meio, se não é uma enfermidade exótica, entretanto aqueles que já a conhecem atribuem-lhe a denominação de "doença de rebanhos de elite", talvez pelo fato de ter sido diagnosticada na sua maioria em rebanhos especializados e por não ter, na maior parte das vezes, a expressão de uma sintomatologia clínica evidente.

A BVD é uma enfermidade que acomete os bovinos e apresenta grande importância econômica em todo mundo (HOUE, 1995; BITSCH & RONSHOLT, 1995; BOLIN & RIDPATH, 1996). É causada por um vírus que pode promover um quadro de doença clínica ou subclínica, algumas vezes podendo ser fatal, e que afeta os sistemas respiratório, reprodutivo, imune e digestivo. Embora a doença tenha sido descrita inicialmente há 50 anos, muitos aspectos de sua patogênese e epidemiologia foram elucidados nos últimos 10 anos (BOLIN & RIDPATH, 1996).

Na primeira descrição da enfermidade, a BVD foi caracterizada como uma doença aguda, de etiologia não definida, contagiosa e transmissível em bovinos, que provocava leucopenia, hipertermia, salivação, lesões nas mucosas, descarga nasal, diarreia, depressão, anorexia, desidratação e aborto em algumas fêmeas prenhes (OLAFSON et al., 1946).

As pesquisas realizadas posteriormente concluíram que o agente responsável pela doença era um vírus, o que direcionou sua denominação para diarreia viral. Anos mais tarde foram feitas várias descrições de outra doença semelhante em alguns aspectos à diarreia viral, só que nesse caso provocava lesões mais severas nas mucosas, levando por isso o nome de doença das mucosas (PERDRIZET et al., 1987).

Na década de 60, Gillespie, citado por PERDRIZET et al. (1987), comparou a diarreia viral e a doença das mucosas por meio de isolamento viral e verificou que os vírus dessas enfermidades possuíam uma relação antigênica muito estreita. Segundo DUBOVI (1998), esse achado levou a conciliar a diarreia a vírus com a doença das mucosas, e por isso ambas passaram a ter uma única denominação - diarreia viral bovina / doença das mucosas.

Atualmente o agente etiológico da BVD está definido como um RNA vírus que juntamente com o vírus da peste suína clássica e o vírus da doença da fronteira ou "border disease" dos ovinos compõem o gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae* (ROEHE et al., 1998), junto com *Flavivirus* humanos e o vírus da hepatite C (NETTLETON & ENTRICAN, 1995).

Se o sucesso atribuído a um vírus é medido pela habilidade em disseminar, causar doença e até mesmo persistir dentro de uma população sem ser descoberto, as pestivirose talvez sejam as mais bem sucedidas entre todas virose bovinas (BAKER, 1987). A ameaça da peste suína clássica à produção de suínos em todo mundo representa a mais séria infecção causada por *Pestivirus* em animais domésticos. Em contraste, as pestivirose nos ruminantes

raramente causam doença de alta patogenicidade, porém o maior problema que apresentam é a habilidade que o vírus possui em atravessar a placenta, invadir o feto e induzir uma infecção persistente que continua por toda a vida do animal (NETTLETON & ENTRICAN, 1995).

O vírus da BVD apresenta dois biotipos baseados na sua replicação em culturas de células: citopatogênico e não citopatogênico (TREMBLAY, 1996). O fato de um dos biotipos não ser citopatogênico não significa que o mesmo não seja patogênico e somente cause infecções subclínicas. Portanto, os biotipos são classificados pela habilidade em causar alterações evidentes em culturas celulares e não quanto à capacidade de causar doença em um animal (DEREGT & LOEWEN, 1995). A grande maioria das amostras de campo do vírus da BVD não produz efeito citopático, e as amostras citopatogênicas são pouco freqüentes, sendo isoladas principalmente de casos de doença das mucosas (BOTTON et al., 1998).

Entre as proteínas apresentadas pela partícula viral, a proteína não estrutural p125 é a mais estudada, devido à associação com a citopatogenicidade. Em células infectadas com o biotipo não citopatogênico é encontrada somente a p125, enquanto que em células infectadas com o biotipo citopatogênico a p125 não é encontrada, mas constata-se duas proteínas derivadas da p125, denominadas p54 e p80. Por isso, até o momento, a expressão da p80 é um marcador molecular da citopatogenicidade (NETTLETON & ENTRICAN, 1995).

O vírus da BVD pertence a dois diferentes genótipos, que são conhecidos como vírus da BVD tipo 1 e vírus da BVD tipo 2 (RIDPATH et al., 1994). O genótipo 1 pode ser subdividido em subgenótipos 1a e 1b (RIDPATH, 2000). Segundo BOLIN & RIDPATH (1996), uma diferença maior que 30% é encontrada quando são comparadas as seqüências do ácido nucléico dos genótipos 1 e 2 do vírus da BVD. Esse grau de dissimilaridade é semelhante ao identificado entre o vírus da BVD e o vírus da peste suína clássica.

Enquanto o tipo antigênico parece ligado ao genótipo, a virulência provavelmente não está ligada, porque cada genótipo contém uma cepa virulenta. O genótipo 2 do vírus da BVD está ligado à forma severa da doença, mas muitos vírus da BVD tipo 2 induzem doença branda ou subclínica, assim como o vírus da BVD tipo 1 pode também estar ligado à forma severa. Ambos os genótipos são similares na sua habilidade de induzir infecção persistente e doença das mucosas (BOLIN & RIDPATH, 1996).

Os *Pestivirus* apresentam simetria icosaédrica, são envelopados, possuem morfologia esférica, sendo partículas com aproximadamente 50 nm de diâmetro, e contêm uma molécula linear de RNA de polaridade positiva (NETTLETON & ENTRICAN, 1995). O vírus perde a infectividade após contato com solventes orgânicos e pH menor que 5,7 e maior que 9,3 (TREMBLAY, 1996). Estudos realizados sobre a estabilidade do vírus fora do hospedeiro sugerem que ele é muito instável para sobreviver por longos períodos no ambiente e que a sua transmissão é quase que exclusivamente devida à

eliminação do vírus pelo animal persistentemente infectado - PI (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; HOUE, 1999).

Entre as várias características do *Pestivirus*, a mais marcante é o seu elevado grau de variabilidade antigênica observado especialmente entre amostras do vírus da BVD e vírus da "border disease" (BOLIN & RIDPATH, 1996; ROEHE et al., 1998), de forma que as regiões de maior variabilidade na partícula viral encontram-se nas glicoproteínas do envelope. A grande variabilidade antigênica observada entre estirpes isoladas do vírus da BVD possui significado especial para a epidemiologia, o diagnóstico e para as estratégias de imunização e controle da enfermidade (EDWARDS & PATON, 1995).

O principal fator na disseminação natural do vírus da BVD é a existência de um animal PI. A infecção do feto bovino com o biotipo não citopatogênico antes do desenvolvimento da competência imunológica, isto é, até 120 dias de gestação, pode resultar na geração de um animal que apresente uma infecção persistente com o vírus da BVD por toda sua vida (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; DUBOVI, 1998). Nessa fase em que são infectados, o sistema imunológico do feto é imaturo, e com isso ele pode erroneamente reconhecer as proteínas virais como próprias (Donis citado por FLORES, 1997). O animal PI torna-se imunologicamente tolerante ao vírus da BVD, e por meio desse portador o vírus se mantém na população bovina. Fêmeas PI geram descendência PI (DUBOVI, 1998).

A imunotolerância tem sido associada somente ao biotipo não citopatogênico do vírus da BVD, porém parece ser específica à estirpe não citopatogênica infectante. Entretanto animais PI podem desenvolver uma resposta imunológica contra estirpes heterólogas do vírus da BVD (BAKER, 1995). Embora os bovinos PI sejam imunotolerantes ao vírus da BVD, eles são imunocompetentes a outros antígenos (BROCK, 1995).

No aspecto epidemiológico, os bovinos PI são considerados a principal fonte de infecção do vírus da BVD porque eliminam uma grande quantidade de vírus em secreções e excreções como descarga nasal, saliva, sêmen, secreções uterinas, urina, fezes, lágrima e leite (HOUE, 1995). O vírus da BVD também é transmitido pelo sêmen criopreservado (FRAY et al., 2000). Logicamente também são fontes de infecção os bovinos em fase aguda da doença e outras espécies como ovinos, caprinos, suínos (HOUE, 1995), além do vírus já ter sido isolado de alpacas, lhamas, camelos (NETTLETON & ENTRICAN, 1995), cervos, girafas, antílopes de várias espécies, bisão, boi almiscarado e gnu, de forma que esses animais silvestres constituem reservatórios de vida livre não identificados e que comprometem programas de erradicação da doença (DUBOVI, 1998). A infecção já foi demonstrada sorologicamente em mais de 40 espécies de ruminantes de cativeiro e silvestres (NETTLETON & ENTRICAN, 1995).

Freqüentemente ocorrem infecções pelo vírus da BVD entre suínos, principalmente em propriedades nas quais haja bovinos. A infecção pelo vírus da BVD em suínos após o nascimento geralmente passa despercebida, no

entanto infecções congênicas podem ser acompanhadas por sinais clínicos da doença, e as lesões *post mortem* são semelhantes às aquelas da forma crônica da peste suína clássica. Suínos persistentemente infectados com o vírus da BVD, quando superinfectados com o biotipo não citopatogênico, não desenvolvem a condição similar de doença das mucosas (TERPSTRA & WENSVOORT, 1997).

O vírus da BVD também é transmitido por embriões provenientes de doadoras PI, pelo uso de soro fetal contaminado no processo de transferência, por receptoras que são PI ou estão na fase aguda da doença, por fômites como luvas (TREMBLAY, 1996), agulhas hipodérmicas e instrumentos veterinários contaminados (NETTLETON & ENTRICAN, 1995), "formigas", água e alimentos contaminados (TREMBLAY, 1996). As moscas são capazes de transmitir o vírus da BVD para bovinos e suínos sob condições experimentais, e também foi demonstrado que o vírus pode sobreviver nesses insetos por 96 horas (GUNN, 1993).

Após o vírus da BVD infectar o rebanho, a infecção progride lentamente entre os bovinos. Ela dissemina-se principalmente pelo contato direto, atingindo primeiro aqueles susceptíveis que convivem com os animais infectados. A intensidade de transmissão parece ser diferente conforme o modo pelo qual o vírus foi introduzido no rebanho. Se o vírus for introduzido por um animal infectado na forma aguda, a disseminação é bem mais lenta do que se a introdução for pelo animal PI. Essa disseminação mais eficiente do animal PI é porque ele libera continuamente uma grande quantidade de vírus (TREMBLAY, 1996). Em um estudo de campo, MOERMAN et al. (1993) constataram que a

disseminação do vírus pode ocorrer com a presença de bovinos transitoriamente virêmicos e na ausência de bovinos PI, porém de forma relativamente baixa.

Estudos sobre prevalência em vários países têm demonstrado que, na população geral de bovinos, os animais PI variam entre 0,5 e 2%, sendo que em bovinos jovens a prevalência pode ser até o dobro (TREMBLAY, 1996). Já BÖTTCHER et al. (1993) afirmaram que a prevalência de animais PI varia entre 0,1 e 1%, e segundo PERDRIZET et al. (1987), a proporção de animais PI nos rebanhos, em alguns casos, pode chegar a 50%.

A distribuição geográfica da BVD é mundial, sendo que 50 a 90% da população bovina adulta apresenta anticorpos no soro sanguíneo contra o vírus da BVD (KRAMPS et al., 1999; ZUIDHOF & MASON, 2000). Teoricamente, todos os rebanhos bovinos estão infectados, e a prevalência de anticorpos em animais adultos está em torno de 60% (NETTLETON & ENTRICAN, 1995). A evidência de infecções nos rebanhos é comprovada pela alta taxa de animais soropositivos presentes na população bovina com idade acima de três anos (Brownlie citado por PITUCO & DEL FAVA, 1998). Segundo BÖTTCHER et al. (1993), a prevalência ultrapassa 80% em animais com mais de dois anos idade.

Nos países escandinavos, a prevalência de animais soropositivos para o vírus da BVD tem sido estimada em 64% na Dinamarca, 46% na Suécia, 19% na Noruega (NUOTIO et al., 1999) e nos Países Baixos está em torno de 65% (KRAMPS et al., 1999). BIUK-RUDAN et al. (1998) encontraram uma prevalência de 79,2% de anticorpos contra o vírus da BVD em vacas leiteiras



com desordens reprodutivas na Croácia. Um estudo semelhante foi realizado na Itália por LUZZAGO et al. (1999), entre os anos de 1995 e 1996, revelando uma prevalência de 53,3%.

No Zimbábwe, MUVAVARIRWA et al. (1995) encontraram 79,2% de reações positivas em quatrocentos e setenta e duas amostras de soro bovino analisadas para anticorpos contra o vírus da BVD. PAISLEY et al. (1996) verificaram que, das três mil oitocentos e noventa e quatro amostras de soros de bovinos de corte provenientes de duzentos e cinquenta e seis rebanhos nos Estados Unidos, 68,6% dos animais apresentaram anticorpos contra o vírus da BVD, distribuídos em 90,6% dos rebanhos pesquisados. SUDHARSHANA et al. (1999) analisaram trezentos e vinte e sete amostras de soro bovino colhidas em várias regiões da Índia, encontrando 15,29% de amostras soropositivas.

Os primeiros levantamentos sorológicos realizados no Brasil foram feitos em 1972 por WIZIGMANN et al. e em 1974 por Vidor (FIGUEIREDO et al., 1997). Posteriormente, vários estudos sorológicos, visando o levantamento da situação de nosso rebanho, foram realizados em vários estados brasileiros. Em São Paulo, LANGONI et al. (1995) estudaram a ocorrência da BVD em cento e oitenta e quatro soros de bovinos, encontrando 39,5% das amostras positivas. No Rio Grande do Sul, KRAHL et al. (1997) pesquisaram anticorpos contra o vírus da BVD em um mil oitocentos e vinte e três soros de bovinos e constataram que 23,4% das amostras eram soropositivas e que das duzentos e sessenta e cinco propriedades examinadas 45,3% apresentaram animais reagentes.

FIGUEIREDO et al. (1997) avaliaram a prevalência de animais com anticorpos contra o vírus da BVD em duzentos e oitenta e sete soros de bovinos colhidos em matadouros de diversas regiões do Estado de Minas Gerais, encontrando soropositividade em 61,47% das amostras. RICHTZEINHAIN (1997) avaliou dois mil quatrocentos e quarenta e oito amostras provenientes de cinquenta e seis propriedades de diversos Estados, encontrando uma prevalência de 65% em Minas Gerais, 84% no Mato Grosso do Sul, 67% no Paraná, 71% no Rio de Janeiro, 73% no Rio Grande do Sul e 78% em São Paulo, ressaltando na pesquisa que em todas as fazendas havia pelo menos um animal reagente ao teste.

A Seção de Febre Aftosa do Instituto Biológico em São Paulo realizou, no período de julho de 1995 a agosto de 1997, quatro mil e sessenta e cinco exames para BVD em soros de rebanhos com problemas reprodutivos originários de vários estados, cujos resultados mostraram que 47,7% das amostras eram positivas. Com relação ao soro de touros provenientes de centrais de inseminação artificial, no período de janeiro de 1997 a fevereiro de 1998, foram encontradas 40,8% de amostras reagentes (PITUCO & DEL FAVA, 1998).

Na pesquisa de CANAL et al. (1998) foi encontrada uma soroprevalência de 56% de reagentes contra o vírus da BVD em bovinos da região Sul do Brasil. A partir dessas amostras também foi realizada a análise molecular, cujos resultados revelaram a existência do genotipo 2 em alguns dos

rebanhos analisados, mostrando que ambos os genótipos estão presentes na região.

FLORES et al. (2000) realizaram seqüenciamento e análise filogenética de dezessete amostras do vírus da BVD isoladas no Brasil, identificando quatro amostras (23,5%) pertencentes ao genótipo 1a, nove amostras (52,9%) ao genótipo 1b e quatro amostras (23,5%) ao genótipo 2. As amostras brasileiras do vírus da BVD tipo 2 apresentaram-se genotipicamente distintas das amostras até então identificadas na América do Norte e Europa, sugerindo pertencerem a um novo subgenótipo. Outras pesquisas também mostram que a infecção pelo vírus da BVD está amplamente difundida no rebanho bovino brasileiro, e as amostras brasileiras do vírus apresentam uma variabilidade antigênica marcante (OLIVEIRA et al., 1996; CANAL et al., 1998; BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 2000).

As infecções em bovinos soronegativos e imunocompetentes para o vírus da BVD ocorrem de forma subclínica, tanto que foi estimado que 70 a 90% das infecções ocorrem sem manifestações de sinais clínicos, e a ocorrência da doença clínica aguda na população bovina é menor que 5% (ZUIDHOF & MASON, 2000). Manifestações clínicas de BVD aparecem mais comumente em rebanhos onde se encontram animais PI com o biotipo não citopatogênico, que são a mais provável fonte do vírus para esta forma de infecção (BAKER, 1995), e menos freqüentemente quando a infecção possa ser oriunda de fômites (HOLLAND et al., 1993).

Considera-se que o período de incubação é aproximadamente de cinco a sete dias, seguido de uma febre transitória e leucopenia. A viremia ocorre de quatro a cinco dias após a infecção e pode persistir por mais quinze dias. Os sintomas da infecção pelo vírus da BVD em um rebanho são muito inespecíficos, de forma que sempre é necessária a ajuda de um exame laboratorial, e também é importante que o médico veterinário conheça as particularidades da infecção (DONATE & MAZZUCHELLI, 1995). Os sinais clínicos encontrados incluem depressão, anorexia, descarga oculonasal, ocasionalmente lesões orais caracterizadas por ulcerações e erosões, diarréia, decréscimo na produção de leite em vacas leiteiras (BAKER, 1995) e morte repentina em alguns animais (ZUIDHOF & MASON, 2000). As mortes seguidas da infecção pelo vírus da BVD são principalmente devido a infecções bacterianas secundárias (BÖTTCHER et al., 1993).

Amostras do vírus da BVD capazes de causar infecções clinicamente aparentes após o nascimento foram descritas por Dubovi nos Estados Unidos (ROEHE et al., 1998). Essa forma de infecção está associada ao que se convencionou chamar de amostras do vírus da BVD tipo 2, em oposição às amostras clássicas, de comportamento caracterizado do tipo 1. Infecções pelo vírus da BVD tipo 2 aparentemente ocorrem após o nascimento do bezerro, causando uma enfermidade caracterizada por problemas respiratórios e severa trombocitopenia, que pode levar o animal à morte (Tijssen citado por ROEHE et al., 1998). A severa trombocitopenia, também denominada de síndrome hemorrágica, quando associada à infecção aguda pelo vírus da BVD

nos animais adultos, resulta em diarreia sanguinolenta, epistaxe, petéquias e equimoses hemorrágicas nas mucosas e sangramento nos locais onde foram aplicadas injeções (BAKER, 1995).

Embora a maior parte das infecções brandas e agudas com o vírus da BVD não sejam diagnosticadas, elas desencadeiam um efeito imunossupressor e com isso aumentam a patogenicidade de outros microorganismos (HOLLAND et al., 1993). Por isso o vírus proporciona um aumento considerável da incidência e severidade de doenças do trato respiratório causadas pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, vírus respiratório sincicial bovino ou pela *Pasteurella haemolytica* (POTGIETER, 1997), e de outras doenças infecciosas como actinomicose, estomatite papilar, enterites causadas por *Salmonella*, *Escherichia coli*, além de helmintoses agudas, mastites e metrites (POTGIETER, 1995). Conforme citação de POTGIETER (1997), outras pesquisas também confirmam que em muitos casos o vírus da BVD desencadeia uma infecção respiratória branda em bezerros susceptíveis, sendo sugerido que algumas cepas do vírus da BVD são mais pneumopatogênicas do que as outras.

Mesmo sendo originalmente isolado de casos de doença entérica e historicamente associado a episódios de doença digestiva, o conhecimento atual da patogenia do vírus da BVD mostra que sua atuação essencial está relacionada aos processos reprodutivos de bovinos. Por isso, considera-se que o maior impacto econômico da infecção na pecuária deve-se aos problemas reprodutivos que ocasiona (ELLIS et al., 1995; FLORES, 1997). Além disso, toda

a epidemiologia da infecção gira em torno da infecção fetal, com o nascimento de bezerros PI (FLORES, 1997).

Quando o vírus infecta a vaca durante o período pré-implantação do zigoto, a mortalidade embrionária é alta, enquanto que a infecção que ocorre no período após a implantação e o quarto mês de gestação (quarenta e vinte e cinco dias) é caracterizada por morte fetal, reabsorção, aborto, mumificação, nascimento de bezerros PI e um grau limitado de teratogênese. Infecções fetais durante o período intermediário de gestação (cento e vinte e cinco a cento e oitenta dias) são caracterizadas pela alta incidência de anomalias congênitas, e no período final da gestação (a partir de cento e oitenta dias), a maior parte das infecções transplacentárias são seguidas pelo nascimento de bezerros dinicamente normais e com altos títulos de anticorpos pré-colostrais (FRAY et al., 2000). Entretanto já foi descrita a ocorrência de alguns abortos e anomalias em bezerros no estágio final de gestação (MOENNIG & LIESS, 1995), e há indícios de que a infecção neste período pode comprometer o sistema imune dos bezerros (Alenius, citado por FRAY et al., 2000). O vírus da BVD pode causar aborto em qualquer fase da gestação, sendo que a maior ocorrência é no primeiro trimestre (LARSON, 1996).

O feto é vulnerável à infecção quando fêmeas não imunes entram em contato com o vírus da BVD. Em termos gerais, a infecção transplacentária é particularmente prejudicial durante os primeiros cento e oitenta dias de gestação, podendo então resultar em morte fetal, deformidades congênitas, nascimento de bezerros PI (LARSON, 1996; FRAY et al., 2000), natimortos,

nascimento de bezerros fracos, débeis, prematuros e com alterações no crescimento (KRAMPS et al., 1999).

A ação do vírus da BVD na reprodução inicia-se antes da concepção. O sêmen de um touro PI, ou que esteja na fase aguda da doença, tem a qualidade alterada, a motilidade reduzida e as anormalidades aumentadas. Sêmen infectado pelo vírus da BVD é suspeito de ser a maior causa de animais "repeat breeders" (MOENNIG & LEISS, 1995). Nas vacas e principalmente em novilhas, DONATE & MAZZUCHELLI (1995) e GROOMS et al. (1998) relataram uma ovarite difusa que se prolonga por mais de sessenta dias, comprometendo o crescimento folicular.

O vírus da BVD pode causar as seguintes alterações congênitas: hipoplasia cerebelar, desmielinização, catarata lenticular, degeneração da retina, alopecia, braquimatismo, tremores, hidrocefalia, cavitação do cérebro (PERDRIZET et al., 1987; LARSON, 1996), deformidades do esqueleto (MOENNIG & LEISS, 1995), hipoplasia pulmonar e atrofia do timo (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Em qualquer período gestacional existe um retardamento no desenvolvimento dos tecidos, manifestado por menor peso dos órgãos e menor peso corporal ao nascimento (DUFFELL & HARKNESS, 1985).

Na maioria das vezes os rebanhos livres de BVD apresentam uma menor incidência de outras doenças e menos distúrbios reprodutivos, além de partos com menor ocorrência de problemas. Em um estudo com rebanhos leiteiros foi observado que, com o aumento da prevalência de animais

soropositivos para o vírus da BVD, os animais passaram a apresentar maior incidência de mastite e retenção de placenta, um desempenho reprodutivo baixo, aumento do intervalo entre partos e dos tratamentos para indução de cio (NISKANEN et al., 1995).

A BVD e a doença das mucosas são duas síndromes clínicas diferentes causadas pelo mesmo vírus. A BVD é resultado de uma infecção aguda em bovinos susceptíveis, que pode ocorrer em qualquer idade após o nascimento, e é uma doença de poucos dias de duração e de baixa letalidade. Em contraste, a doença das mucosas é quase invariavelmente fatal, porém de baixa morbidade e que ocorre em bovinos que apresentam uma infecção persistente adquirida quando fetos, caracterizada por imunotolerância específica ao vírus infeccioso e conseqüente ausência de anticorpos - aspectos constatados nos animais PI (DUFFELL & HARKNESS, 1985).

A ocorrência da doença das mucosas em rebanhos é limitada a poucos animais. Na maioria dos casos a superinfecção com o vírus citopatogênico está ligada à mutação do vírus não citopatogênico. Acredita-se que a mutação é uma forma de geração de vírus citopatogênico superinfectante, devido à similaridade antigênica entre os dois biotipos isolados nesses casos. Os dois biotipos são isolados em bovinos com doença das mucosas, e devido a essa similaridade supõe-se que o sistema imune de um animal PI não reconhece o biotipo citopatogênico, portanto falta proteção, e o animal desenvolve a doença. O animal desenvolve sinais clínicos como febre, depressão, lesões erosivas na mucosa oral, hipersalivação e uma diarreia



profusa e aquosa seguida de morte (DEREGT & LOEWEN, 1995). A natureza da interação entre o vírus persistente e o vírus superinfectante no desenvolvimento da doença das mucosas permanece indefinida. A doença das mucosas pode ser causada tanto pelo vírus da BVD tipo 1 quanto pelo vírus da BVD tipo 2 (RIDPATH, 2000).

A terapia utilizada contra a infecção aguda da BVD é exclusivamente de suporte. Devem ser realizadas hidratações com soluções hidroeletrólíticas para correção da desidratação, uso de antidiarréicos e protetores gastrointestinais, devido à diarreia. Antibióticos são utilizados para o tratamento de infecções bacterianas secundárias, e o uso de corticosteróides é contra-indicado, devido à potencialização do efeito imunossupressor induzido pelo vírus (BAKER, 1995).

O primeiro passo para qualquer investigação da ocorrência da enfermidade deve ser o conhecimento do histórico do rebanho. Os dados de pelo menos dois anos devem conter informações a respeito da aquisição de novos animais, abortos, períodos de excessiva mortalidade neonatal, bezerros que apresentam comprometimento do desenvolvimento, bezerros com anomalias congênitas e episódios de doença entérica (DUFFEL & HARKNESS, 1985). Até os clínicos mais experientes têm dificuldades em apresentar um diagnóstico sugestivo de infecções causadas por *Pestivirus* baseados puramente em sinais clínicos; sendo assim, os testes laboratoriais são sempre necessários, e a colheita das amostras deve ser feita de forma correta (NETTLETON & ENTRICAN, 1995).

Os vírus da BVD, da peste suína clássica e da "border disease" são antigenicamente relacionados, e sua identificação é comprometida devido à reatividade sorológica cruzada existente entre os vírus. Existem anticorpos monoclonais que reconhecem todos os *Pestivirus*, enquanto outros são específicos para o vírus da peste suína clássica ou para o vírus da BVD (DUBOVI, 1998). Além disso a detecção e o controle do vírus da BVD também são dificultados pela heterogeneidade viral, que resulta em diferenças nos epítopos neutralizantes, na citopatogenicidade e na virulência (RIDPATH et al., 1994). Outro fator relatado por KREUTZ et al. (2000) é que, especificamente no Brasil, é necessária a produção de anticorpos monoclonais contra os vírus isolados no campo, pois, sendo antigenicamente distintos das estirpes tradicionais, a definição das propriedades antigênicas desses vírus é de grande importância, resultando num melhor diagnóstico que estaria dentro da realidade nacional.

Como na maioria das infecções virais, as tradicionais formas de diagnóstico, como o isolamento viral e a sorologia, constituem os métodos básicos para o diagnóstico da BVD. Embora outros métodos tenham sido avaliados, o isolamento viral é bastante seguro; a rápida identificação do antígeno do vírus da BVD em amostras de tecidos pode ser realizada pelos métodos imuno-histoquímicos, de imunofluorescência ou imunoenzimático em fragmentos teciduais congelados (BROCK, 1995). Pesquisadores como THÜR et al. (1996) demonstraram que o vírus da BVD pode ser detectado utilizando métodos imuno-histoquímicos a partir da biópsia de pele da nuca. O uso da

reação da polimerase em cadeia é uma vantagem sobre o isolamento viral devido à não interferência de anticorpos neutralizantes e também por ser uma técnica mais sensível e específica (BROCK, 1995).

A identificação de animais PI é realizada mais rotineiramente pelo isolamento viral. Em alguns casos, o soro sanguíneo é utilizado para o isolamento viral, porém em bezerros os anticorpos colostrais podem interferir, e desta forma apresentar um resultado falso-negativo. Devido a essa interferência, a melhor amostra a ser utilizada é o sangue total (BROCK, 1995). A determinação de animais PI deve ser somente realizada pelo isolamento do vírus em amostras colhidas em intervalos de três a quatro semanas (BROCK, 1995; SANDVIK, 1999).

Ainda hoje muitos criadores e médicos veterinários consideram o custo dos testes para a identificação de animais PI muito elevado. Além disso, as amostras que causam infecções persistentes não são citopatogênicas e desta forma requerem a identificação do vírus por técnicas imuno-histoquímicas, o que torna a prova um pouco mais cara e demorada. Infelizmente, o custo do teste não é confrontado com os prejuízos decorrentes da manutenção de um ou mais animais PI no rebanho (ROEHE et al., 1998).

O vírus pode ser isolado de animais que estão na fase aguda da infecção, enquanto que superada essa fase ele não é mais isolado, mas num teste sorológico podem ser detectados altos títulos de anticorpos. Os animais PI também podem soroconverter após uma superinfecção ou vacinação com um

vírus da BVD que seja antigenicamente distinto do vírus persistente (DEREGT & LOEWEN, 1995).

A grande variabilidade genética e antigênica das amostras do vírus da BVD não possui apenas significado biológico e acadêmico, de forma que essa diversidade reveste-se de grande relevância prática para o diagnóstico e controle da infecção. A baixa reatividade sorológica cruzada entre as amostras do vírus tipo 1 e 2 indica a necessidade da inclusão de vírus dos dois genótipos em testes sorológicos (FLORES et al., 2000).

Estudos sobre a detecção da resposta imune contra o vírus da BVD em animais imunocompetentes, ou seja não PI, têm demonstrado que anticorpos contra o vírus podem ser detectados no soro a partir de três semanas após a infecção aguda e persistem por vários anos (SANDVIK, 1999). Para DUFFELL & HARKNESS (1985), os títulos de anticorpos contra o vírus podem persistir por toda a vida do animal, embora o declínio do título seja observado após alguns anos. FREDRIKSEN et al. (1999), num experimento para verificar os títulos de anticorpos neutralizantes no soro de bovinos infectados de forma experimental e natural com o vírus da BVD, verificaram que os títulos apresentaram-se, respectivamente, moderados e altos por um período de três anos após a infecção, sem que houvesse uma reinfecção.

O método sorológico mais comumente usado para determinar anticorpos contra o vírus da BVD é a soroneutralização (BROCK, 1995). O teste de ELISA é também um eficiente método sorológico que apresenta uma excelente especificidade e sensibilidade. Devido a essas características, a

referida técnica é uma alternativa de grande valor na detecção de anticorpos contra o vírus da BVD em bovinos (JUSTEWICZ et al., 1987; DURHAM & HASSARD, 1990; CHO et al., 1991; MUVAVARIRWA et al., 1995). Além disso, o teste de ELISA é também um método de diagnóstico versátil e prático por várias razões: é independente de culturas celulares, facilmente aplicado para testar um grande número de amostras e os resultados podem ser obtidos em poucas horas (SANDVIK, 1999).

Na literatura existem várias descrições de testes de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD no soro sanguíneo (CHU et al., 1985; HOWARD et al., 1985; BOCK et al., 1986; JUSTEWICZ et al., 1987; DURHAM & HASSARD, 1990; CHO et al., 1991), e com a viabilidade de anticorpos monoclonais para o vírus da BVD, foram desenvolvidos vários tipos de ELISA com diferentes antígenos e anticorpos de captura (BROCK, 1995).

Segundo MUVAVARIRWA et al. (1995), o teste de ELISA apresenta menor limiar de detecção do que o teste de soroneutralização para detectar anticorpos contra o vírus da BVD, inclusive contra todos os componentes virais, o que na soroneutralização ocorre somente contra alguns antígenos virais. No estudo de MARS et al. (1999), o teste de ELISA detectou anticorpos treze dias após a infecção experimental com o vírus da BVD.

A primeira descrição do teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de leite foi feita por NISKANEN et al. (1989), e o desenvolvimento desse teste para pesquisar anticorpos contra o vírus da BVD em leite de conjunto do tanque de expansão facilitou o

diagnóstico de situação da enfermidade nos rebanhos (NISKANEN, 1993). Na Europa o ELISA é amplamente empregado para detectar anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão ou em uma amostragem sorológica do rebanho (VAN OIRSCHOT, 1998). Tanto é que NUOTIO et al. (1999) relataram o uso do teste de ELISA para verificar a prevalência e distribuição geográfica da BVD na Finlândia.

Segundo PATON et al. (1998), a detecção de anticorpos no leite do tanque de expansão é um método prático e de baixo custo para determinar o "status" de doenças em rebanhos ingleses. Ele é amplamente utilizado em esquemas de controle de doenças como BVD, brucelose, leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa dos bovinos e leptospirose. As análises periódicas do leite do tanque de expansão são úteis no controle de doenças nos rebanhos, e no caso da BVD, quando combinadas com a sorologia dos animais, são úteis para estabelecer a presença de animais PI (HOUE, 1995). A pesquisa de anticorpos entre poucos animais do rebanho ou no leite do tanque de expansão dá uma evidência indireta da presença de animais PI, pois estes mostram a sua presença infectando outros animais no rebanho (HOUE, 1999).

O uso do leite de conjunto do tanque de expansão apresenta muitas vantagens: facilidade de obtenção, exame de todo o rebanho em uma única amostra, o custo é substancialmente mais baixo do que o de métodos que requerem amostras individuais (VAN OIRSCHOT, 1998; LINDBERG & ALENIUS, 1999), apresenta grandes vantagens práticas para o teste em larga escala de estudos epidemiológicos (KLINTEVALL et al., 1991) e é útil em

programas de erradicação de enfermidades (HARTMAN et al., 1997; LINDBERG & ALENIUS, 1999). A desvantagem é que seu uso limita-se apenas a rebanhos leiteiros não vacinados (VAN OIRSCHOT, 1998; LINDBERG & ALENIUS, 1999).

O exame regular de amostras de leite do tanque de expansão, para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD em rebanhos sem um programa de vacinação, é um método conveniente e de baixo custo para a investigação de alterações da prevalência de vacas soropositivas. Em rebanhos com problemas tais como aborto ou bezerros com defeitos congênitos causados pelo vírus, a maioria das vacas são soropositivas, e nesses casos o conhecimento do histórico e dos valores de leitura de densidade óptica dos resultados com o teste das amostras do leite do tanque de expansão pode ajudar a decidir sobre a necessidade de outras investigações. Em rebanhos nos quais a amostra do tanque de expansão não contém anticorpos é improvável que o vírus da BVD esteja causando infecção nos animais (NISKANEN, 1993).

Títulos moderados ou altos de anticorpos contra o vírus da BVD no leite de conjunto do tanque de expansão indicam que o rebanho tem infecção ativa ou que ela pode ter cessado recentemente. Nos animais infectados, os anticorpos são detectados no soro sanguíneo por um longo período após a infecção, diferentemente do leite de conjunto, que continua apresentando títulos de anticorpos detectáveis por algum tempo, mas que vão gradativamente diminuindo até tornarem-se negativos (LINDBERG & ALENIUS, 1999). Uma combinação da pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD no leite do tanque de expansão, leite individual, principalmente de novilhas, e

sangue de bezerros pode ser utilizada para identificar rebanhos recentemente infectados (NIKASNEN et al., 1995; FREDRIKSEN et al., 1998b).

Para a leucose enzoótica bovina, o leite mostrou ser um material seguro para a detecção de anticorpos em amostras individuais, bem como em amostras de conjunto do tanque de expansão (KLINTEVALL et al., 1991). No entanto a determinação da presença de anticorpos contra o vírus da BVD no soro é mais sensível e específica do que no leite (NISKANEN et al., 1989).

O estudo realizado por PATON et al. (1998), na pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD e outros vírus em leite de conjunto do tanque de expansão na Inglaterra, revelou uma prevalência de 95,4% de rebanhos positivos, dos quais 65,5% apresentaram altos títulos de anticorpos para o vírus da BVD. Segundo HOUE & PALFI (1993), todos os rebanhos com altos títulos de anticorpos contra o vírus da BVD no leite do tanque de expansão possuem infecção ativa, o que levou os pesquisadores a considerar que o título de anticorpos em leite do tanque de expansão parece ser um bom indicador de infecção ativa em rebanhos.

NISKANEN (1993), em um estudo com cento e vinte e três rebanhos leiteiros na Suécia e na Finlândia, demonstrou que a análise do título de anticorpos contra o vírus da BVD pelo ELISA a partir de amostras de leite do tanque de expansão, além de ser utilizada para estimar a exposição do rebanho não vacinado ao vírus, pode também determinar a incidência da infecção em rebanhos quando realizadas amostragens periódicas. Dos rebanhos analisados, em cento e três foram detectados anticorpos na amostra de leite do tanque de



expansão e em vinte rebanhos não foram detectados anticorpos. Destes vinte rebanhos negativos, dezessete comprovaram não ter anticorpos através de análises de amostras individuais de leite, e os três rebanhos remanescentes apresentaram uma baixa prevalência de vacas soropositivas. Com um intervalo de um ano foram colhidas novamente amostras de leite do tanque de expansão em cento e cinco rebanhos dos cento e vinte e três anteriormente citados, mostrando que em cinco rebanhos houve um aumento dos títulos de anticorpos detectáveis nesse período.

NISKANEN et al. (1991) avaliaram, pelo ELISA indireto, a determinação de títulos de anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de soro sangüíneo, leite individual e leite de conjunto em quinze rebanhos leiteiros, encontrando uma excelente correlação entre a presença de anticorpos no leite do tanque de expansão e a prevalência de vacas soropositivas contra o vírus da BVD. A média da prevalência de vacas soropositivas nos rebanhos foi de 45,5%, sendo que em oito rebanhos a porcentagem de vacas soropositivas variava de 52 a 100%. Anticorpos foram detectados no leite do tanque de expansão nos rebanhos nos quais a prevalência de animais soropositivos foi igual a ou maior que 4%.

Uma estimativa da prevalência de vacas em lactação soropositivas para o vírus da BVD foi estabelecida por NISKANEN (1993) a partir de valores de absorbância obtidos no teste de ELISA indireto no leite de conjunto do tanque de expansão. Nessa estimativa, os rebanhos foram classificados de 0 a 3, de acordo com os valores de absorbância apresentados pelo leite do tanque

de expansão num comprimento de onda de 450 nm. Assim, para valores menores que 0,050 (classe 0), a porcentagem de vacas soropositivas era menor que 5%, enquanto que em valores de absorvância entre 0,050 e 0,250 (classe 1), a estimativa de vacas soropositivas era de 5 a 25%. Para valores de absorvância entre 0,250 e 0,550 (classe 2), 25 a 65% das vacas eram soropositivas, e em valores de absorvância superiores a 0,550 (classe 3), mais de 65% das vacas eram soropositivas.

KRAMPS et al. (1999) compararam os resultados obtidos na detecção de anticorpos no ELISA em amostras de plasma e de soro, encontrando similaridade entre ambos. Em contraste, o ELISA usando amostras de leite individual mostrou uma baixa sensibilidade quando comparado com o ELISA em amostras de soro sangüíneo. A baixa sensibilidade do ELISA realizado nas amostras testadas de leite individual, quando comparadas com as amostras de soro, pode ser explicada pelo fato de que a concentração de imunoglobulinas no soro sangüíneo equivale até quarenta vezes a concentração no leite. Além disto, SCHRIJVER & KRAMPS (1998) também mencionaram que a escolha da amostra a ser testada pode comprometer o diagnóstico pelo teste do ELISA, pois em programas de controle sanitário não se pode utilizar apenas o leite, porque a quantidade de imunoglobulinas no leite bovino é bem menor do que a quantidade encontrada no soro sangüíneo.

Resultados parecidos foram encontrados por KLINTEVALL et al. (1991) na titulação de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina no soro e leite de dez vacas. Desse estudo, os autores constataram que dos

animais soropositivos, somente 4 a 20% tinham anticorpos no leite. No entanto a análise do colostro mostrou títulos bem maiores de anticorpos do que o soro.

Segundo NISKANEN et al. (1989), o leite de um quarto do úbere é representativo de todos os quartos em relação ao título de anticorpos contra o vírus da BVD, independentemente da quantidade de células. Além disso, no estudo de KLINTEVALL et al. (1991), não foram encontradas diferenças significativas nos títulos de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina nas diferentes amostras colhidas durante diferentes períodos do dia.

KLINTEVALL et al. (1991) também verificaram que o leite não diluído apresenta reações inespecíficas devido aos resíduos de gordura, dando resultados tanto falso-positivos como falso-negativos, e para contornar esses problemas, uma diluição do leite de 1:5 seria bastante favorável. O efeito da mastite também foi pesquisado no soro e leite obtidos de onze vacas com mastite clínica. Quatro vacas apresentaram reações falso-positivas no leite mastítico porque elas foram negativas nos exames com soro sangüíneo e leite de quarto não infectado. Os resultados da pesquisa também levaram os autores a supor que a mastite subclínica ocasionalmente causa reações falso-positivas no ELISA, pelo fato de haver um aumento de células somáticas no leite do animal.

NISKANEN et al. (1989) colheram amostras periódicas de soro e leite de cinco vacas durante o período de lactação e verificaram que o título de anticorpos contra o vírus da BVD no soro, indicado por valores de absorbância, permaneceu praticamente o mesmo durante o período observado. Já o título de

anticorpos no leite desnatado diminuiu à medida que a produção de leite aumentou após o parto, sendo que os títulos mais baixos foram observados vinte e uma semanas após o parto. À medida que se aproximava do período seco, o título de anticorpos aumentou, atingindo parâmetros semelhantes aos do início da lactação.

Amostras individuais de leite com altos títulos de anticorpos podem ser diluídas em amostras de leite sem anticorpos entre as diluições de 1:256 e 1:1.024 e mesmo assim continuarem positivas no ELISA indireto. Portanto o teste do leite de conjunto pode ter capacidade de revelar a presença de um único animal soropositivo, mesmo dentro de rebanhos grandes com duzentos e cinquenta a quinhentas vacas em produção (NISKANEN, 1993). FREDRIKSEN et al. (1998a) também afirmaram que a presença de poucos animais com altos títulos de anticorpos pode resultar em títulos altos de anticorpos no leite de conjunto em tanque de expansão, levando muitas vezes a superestimar o número de animais soropositivos, especialmente em rebanhos pequenos.

FREDRIKSEN et al. (1998a) também mencionaram vários fatores que interferem no título de anticorpos quando analisadas amostras periódicas do leite do tanque de expansão, tais como a introdução no rebanho de animal PI, rebanhos com um ou poucos animais em infecção ativa, ovinos infectados que convivem com os bovinos, presença de um ou alguns animais com altos títulos de anticorpos no leite que podem resultar em altos títulos no leite de conjunto, variações de estirpes do vírus e a presença do vírus no leite, que

pode ser neutralizado pelos anticorpos presentes. Segundo NISKANEN et al. (1995), nesses casos o título de anticorpos detectáveis é bem menor, e em casos extremos pode resultar em amostras falso-negativas.

O prognóstico para um rebanho e as estratégias para controle de infecções pelo vírus da BVD dependem primeiramente do conhecimento da epidemiologia da infecção, seguido pelo conhecimento do valor de proteção da imunidade, especialmente para o feto, e, terceiro, da confiança nos meios diagnósticos (MOERMAN et al., 1993).

A imunidade natural passiva parece proteger os bezerros contra a infecção pelo vírus da BVD na fase inicial da vida, e as concentrações dos anticorpos de origem materna diminuem com o tempo, não sendo mais detectáveis entre cento e cinco e duzentos e trinta dias de idade (BAKER, 1987). Anticorpos de origem colostrar neutralizantes para o vírus da BVD possuem uma meia-vida de aproximadamente três semanas em bezerros e podem ser detectados por seis meses ou mais (HOWARD et al., 1989; BOLIN & RIDPATH, 1995). No estudo realizado por OBANDO et al. (1999), a meia-vida dos anticorpos de origem colostrar encontrada foi de trinta e quatro mais ou menos doze dias.

O primeiro passo para o controle da BVD é identificar e eliminar todos os animais PI do rebanho. Isso é necessário, pois esses animais são provavelmente o reservatório natural do vírus não citopatogênico da BVD, e também podem ser a fonte primária de vírus citopatogênico, que foi originário de mutações sofridas pelo biotipo não citopatogênico (BOLIN, 1990).

A prevenção da doença em bovinos pode ser realizada com o emprego de vacinas atenuadas ou inativadas. A infecção pelo vírus da BVD pode ser bem controlada pela vacinação, pois manter um rebanho livre do vírus e sem vacinação é difícil, porque o vírus encontra-se presente na natureza de diversos modos. Outro fator é a falta de testes sorológicos para comprovar a infecção que pode permanecer subclínica. O resultado final pode culminar com o nascimento de animais PI e a ocorrência de grandes perdas econômicas. Por isso certamente seria mais vantajoso vacinar os animais para prevenir a doença (DEREGT & LOEWEN, 1995). Considerando que uma alta prevalência do vírus da BVD em rebanhos causa grandes prejuízos econômicos, a vacinação deve ser certamente indicada, desde que haja disponibilidade de vacinas eficazes e seguras (VAN OIRSCHOT et al., 1999).

Segundo EDWARDS & PATON (1995), o surgimento de novas variantes do vírus em bovinos aumenta a probabilidade de que as vacinas existentes, compostas de uma única estirpe viral, não cheguem a induzir uma proteção eficiente. Isso pode ser atribuído ao fato de que a pressão imune pelo uso acentuado de tais vacinas possa favorecer o surgimento desses novos vírus.

As diferenças antigênicas entre os genótipos do vírus da BVD permitem que o vírus não seja neutralizado pela resposta imune induzida pela vacina inativada. Isso foi mostrado quando um vírus, identificado como tipo 2, foi isolado de um animal que nasceu PI da gestação de uma vaca saudável que tinha sido vacinada com uma vacina inativada composta apenas do tipo 1

(BOLIN & RIDPATH, 1996). RIDPATH et al. (1994) constataram que esses vírus são tão diferentes antigenicamente, que uma vacina inativada que protege contra um genotipo pode não proteger contra outro genotipo. Já os resultados de outro estudo, realizado por CORTESE et al. (1998), foram diferentes e indicaram que a vacinação com o vírus vivo modificado tipo 1 pode proteger bezerros contra a infecção pelo vírus tipo 2.

BOTTON et al. (1998) verificaram, num trabalho sobre a caracterização antigênica do vírus da BVD isolado no Brasil, que algumas estirpes são pouco neutralizadas pelos anticorpos contra estirpes de referência internacional, o que leva ao questionamento sobre o grau de proteção conferido por tais vacinas compostas de estirpes importadas. A pesquisa de FLORES et al. (2000) revelou uma variabilidade marcante de amostras brasileiras do vírus da BVD, tanto genética quanto antigênica, com a identificação de vírus dos dois genotipos e subgenotipos, e que algumas amostras brasileiras do vírus da BVD, em especial as amostras do tipo 2, apresentaram reatividade sorológica distinta das estirpes vacinais do tipo 1. Esses dados sugerem que a imunização de animais com vacinas produzidas com estirpes clássicas do vírus pode não conferir proteção adequada contra algumas amostras nacionais do vírus.

Segundo VAN OIRSCHOT et al. (1999), existem muitas tentativas de desenvolver vacinas com antígenos marcados para diferenciar os animais infectados em rebanhos vacinados. Até o momento já foi estudada uma vacina contendo somente proteínas estruturais do vírus da BVD que não induz a

produção de anticorpos contra a proteína não estrutural NS2/3. Ao pesquisar a presença de anticorpos contra essa proteína, torna-se possível detectar os bovinos infectados naturalmente com o vírus íntegro e diferenciá-los dos vacinados.

Para proteger o rebanho contra BVD é preciso ter em mente que a vacinação, além do objetivo sanitário, apresenta um custo. Desta forma, devem ser analisados esses dois aspectos antes de ser tomada qualquer decisão. As vacinas contra BVD devem ser capazes de evitar a infecção dos animais com o vírus de campo e não permitir a passagem do vírus ao feto durante a gestação, uma vez que esse é o aspecto mais danoso da infecção. A prática tem demonstrado que essas vacinas não são completamente eficazes nesse sentido, pois dificilmente conseguem eliminar completamente o nascimento de animais PI. Assim, as vacinas contra BVD são também para minimizar e não erradicar problemas com o vírus da BVD (ROEHE & WEIBLEN, 2000).

Programas de prevenção e controle sem o uso de vacinas são utilizados na Noruega, Suécia e Finlândia e têm como estratégia identificar rebanhos livres da infecção e manter o estado sanitário desses rebanhos por meio do exame de amostragens periódicas de leite do tanque de expansão (BITSCH & RONSHOLT, 1995). Programas semelhantes de controle e erradicação da BVD realizados na Itália (FERRARI et al., 1999), na França (THIBAUT et al., 1993), na Eslovênia (GROM & BARLIC-MAGANJA, 1999) e nas Ilhas Shetland (SYNGE et al., 1999) utilizam o teste de ELISA para detecção de anticorpos no soro sanguíneo aliado a outras técnicas para detecção de



anticorpos ou antígeno viral. Nos países escandinavos, onde programas de erradicação estão em andamento, a prevalência e a incidência do vírus da BVD entre bovinos está diminuindo a cada dia. Na Noruega, o vírus da BVD já parece ser mais prevalente em renas do que em ovinos e bovinos (VAN OIRSCHOT, 1998).

Segundo HOUE (1999), em países que não adotam a vacinação, a transmissão do vírus da BVD de animais PI pode ser medida indiretamente, pelo exame sorológico de animais jovens ou pela determinação de títulos de anticorpos em leite de conjunto. O uso e a interpretação desses métodos de detecção de anticorpos estão intimamente ligados à epidemiologia da infecção. Portanto podem ser consideradas cinco fases no ciclo da infecção: fase A - rebanhos recentemente infectados, sem a presença de animais PI (muitas vezes somente uma pequena porcentagem do rebanho é soropositiva); fase B - rebanhos infectados com animais PI de três a quatro meses de idade (muitos animais estão passando por uma infecção aguda, e a disseminação do vírus depende de como os animais estão agrupados); fase C - rebanhos infectados com animais PI com idade superior a três e quatro meses (normalmente mais do que 90% dos animais são soropositivos); fase D - rebanhos infectados de onde animais PI tenham sido removidos recentemente (os bezerros tornaram-se soronegativos após seis a oito meses de idade, não estão presentes anticorpos colostrais, e as vacas permanecem soropositivas); fase E - rebanhos infectados de onde animais PI foram removidos há vários anos (todos os bezerros, exceto aqueles que apresentarem anticorpos colostrais, e muitas

vacas jovens são soronegativas. Eventualmente alguns rebanhos tornam-se completamente negativos).

Segundo BEZEK & MECHOR (1992), a ausência de resposta sorológica após a vacinação não pode ser utilizada como um critério de identificação de animais PI, pelo fato de que alguns desses animais podem soroconverter após a vacinação e também porque outros animais imunocompetentes podem não responder bem à vacinação. A extinção do vírus da BVD do rebanho não pode ser conseguida apenas pela identificação do animal PI e sua remoção do rebanho, mesmo se estiver combinada com o exame de todos os neonatos por seis a doze meses após a remoção, e sim deve ser prolongada a pesquisa de neonatos virêmicos por mais de um ano (MOERMAN et al., 1993).

Para prevenir o desenvolvimento de doença deve-se prevenir a entrada de animais infectados, adquirindo bovinos somente de rebanhos não infectados ou que tenham um efetivo programa de vacinação contra BVD, evitar a compra de animais de locais com alta rotatividade comercial, testar animais de compra recente para detecção de PI, além de mantê-los isolados por 30 dias, adquirir de preferência novilhas de reposição e animais não gestantes, pois dessa forma se reduz a probabilidade da introdução de bezerro PI (ZUIDHOF & MASON, 2000).

Estimativas de perdas econômicas devidas à infecção pelo vírus da BVD variam dependendo do "status" imune da população e da patogenicidade da estirpe viral infectante. A introdução da infecção numa população susceptível

invariavelmente causa grandes perdas, até chegar a um estado de equilíbrio (HOUE, 1999). Esse estado de equilíbrio é alcançado quando no rebanho não existam animais soronegativos no início da gestação em contato com animais PI. Nessa condição, a doença é considerada autolimitante, e a probabilidade disso acontecer está relacionada a todos os fatores que afetam a prevalência de animais soronegativos no início da gestação, a prevalência de animais PI, o grau de contato entre esses grupos e a mortalidade de animais PI (LINDBERG & ALENIUS, 1999).

Uma única manifestação da infecção, mesmo que pequena, constitui uma perda econômica, e a vacinação pode mascarar as conseqüências da infecção e o problema pode persistir no rebanho (DUBOVI, 1998). O estudo realizado por WOODARD (1994), em Wyoming nos Estados Unidos, verificou que em rebanhos não vacinados as perdas atribuídas à BVD, quando relacionadas ao número total de abortos ocorridos nos rebanhos, raramente ultrapassam 5%, enquanto que as perdas relacionadas ao nascimento de bezerros fracos e débeis estão em torno de 20 a 30%.

BENNETT et al. (1999), por meio de um estudo sobre o impacto de doenças em propriedades britânicas, mostraram que as perdas na produção devido à BVD dependem das variações na incidência da doença. O principal componente desse prejuízo é a mortalidade de bezerros, seguida da mortalidade e do descarte prematuro de vacas leiteiras. Segundo FREDRISKEN et al. (1998a), provavelmente depois da mastite, as infecções pelo vírus da BVD

são causas de grandes perdas econômicas em rebanhos leiteiros de muitos países.

O pouco conhecimento que se tem sobre a importância da doença, associado à alta prevalência de animais soropositivos, pode aumentar a probabilidade da disseminação da infecção entre os rebanhos, o que confirma a necessidade da implantação de programas de controle em rebanhos leiteiros em larga escala. Tais programas devem ser baseados na difusão da informação sobre as consequências da doença, nos procedimentos racionais de identificação da presença e magnitude do problema, na vacinação para proteção de rebanhos jovens e na remoção de animais PI (AMES & BAKER, 1990).

Ultimamente, devido ao sucesso que tem sido obtido no combate à febre aftosa, associado à crescente preocupação com a sanidade bovina, médicos veterinários e criadores vêm se conscientizando da importância da BVD na bovinocultura. Essa preocupação vem sendo também impulsionada indiretamente pela suinocultura, embora um tanto que subliminarmente por meio da implantação do Plano Nacional de Erradicação da Peste Suína Clássica (BRASIL, 1992). Isso se deve ao fato de que os *Pestivirus* dos ruminantes, embora diferentes do vírus da peste suína clássica, podem ocasionalmente infectar suínos, levando ao comprometimento de áreas onde a peste suína clássica encontra-se em erradicação (ROEHE et al., 1998).

Mesmo com a introdução de novos meios diagnósticos, os seus altos custos, aliados à pouca importância dada à BVD, consistem no grande

entreve para que seja verificada a real situação de cada rebanho. A análise sorológica de um número representativo de animais pode mostrar se o rebanho entrou em contato com o vírus ou não, porém na maior parte das vezes torna-se onerosa para o criador, principalmente quando se refere a grandes rebanhos. Entretanto, uma alternativa viável, tanto do ponto de vista econômico quanto prático, seria verificar a presença de anticorpos nas amostras de leite de conjunto em rebanhos não vacinados.

### 3 OBJETIVOS

1. Verificar a presença da infecção pelo vírus da BVD em vacas lactantes de rebanhos leiteiros em duas regiões distintas, pela pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto do tanque de expansão proveniente de todos os animais em rebanhos não vacinados. A partir dos dados obtidos, verificar as correlações existentes entre a presença de anticorpos no soro sanguíneo e no leite de cada animal e entre a proporção de animais soropositivos lactantes e a presença de anticorpos contra o vírus da BVD no leite de conjunto do tanque de expansão.
2. Comparar os resultados obtidos entre duas diferentes amostras de leite de conjunto: a primeira colhida do tanque de expansão de cada propriedade, sem considerar a característica de produção individual de cada animal, e a segunda obtida de forma homogênea, na qual a amostra de conjunto contém volumes iguais do leite produzido por cada animal.
3. Comparar a ocorrência da infecção pelo vírus da BVD nas duas regiões estudadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização das populações estudadas

O estudo foi realizado em dez rebanhos leiteiros, sendo cinco localizados na região Sul do Estado de Minas Gerais e cinco na região Nordeste do Estado de São Paulo. Todas as propriedades, independentemente da região, foram selecionadas a partir dos seguintes critérios:

- sem histórico de vacinação contra BVD;
- fossem preferencialmente rebanhos “fechados” ou que apresentassem o mínimo de movimentação de animais.

As propriedades estudadas no Sul do Estado de Minas Gerais estavam localizadas nos municípios de Machado, Poço Fundo e Turvolândia, e no Nordeste do Estado de São Paulo, nos municípios de Jaboticabal, Aramina, Ituverava e Morro Agudo. Para o presente estudo foram utilizadas somente as vacas em produção, em qualquer fase de lactação, independentemente de idade e volume de produção. O número de animais por propriedade era variável de no mínimo vinte e no máximo setenta animais (Tabela 1). Foram analisados no total trezentos e setenta e seis animais, sendo duzentos e quarenta e cinco na região Sul do Estado de Minas Gerais e cento e trinta e um na região Nordeste do Estado de São Paulo (Tabela 2).

Também foi feito um questionário relacionado ao histórico dos rebanhos, a fim de obter informações a respeito do estado sanitário, do manejo

e visando principalmente a ocorrência de sintomatologia sugestiva da doença em questão.

## **4.2 Colheita das amostras**

Para o desenvolvimento do estudo foi feita apenas uma visita por propriedade, oportunidade em que foram colhidas amostras de sangue e leite individualmente de cada vaca lactante e uma amostra do leite de conjunto do tanque de expansão. O procedimento adotado quanto à colheita foi idêntico para todas as propriedades estudadas. Desse modo, foram colhidas trezentos e setenta e seis amostras de soro sangüíneo, trezentos e setenta e seis amostras individuais de leite e dez amostras do leite de conjunto do tanque de expansão, totalizando setecentos e sessenta e duas amostras (Tabela 3).

### **4.2.1 Soro sangüíneo**

As amostras de sangue foram colhidas da veia caudal mediana, com agulhas descartáveis, em frascos esterilizados tipo "vacutainer" de 10 mL e sem aditivos. Após a colheita, a amostra permaneceu à temperatura ambiente por um período de quatro horas para ocorrer a coagulação. Decorrido esse tempo, o sangue foi acondicionado em caixa de "isopor" com gelo. Levado ao laboratório, foi centrifugado por cinco minutos a 2.000 rpm. Separado o soro sangüíneo, o sobrenadante livre de hemólise foi acondicionado em microtubos



tipo "eppendorf" com capacidade para 1,5 mL e posteriormente estocados à temperatura de -20°C até o momento do uso.

## **4.2.2 Leite**

### **4.2.2.1 Amostra individual**

Após a higienização dos tetos das vacas e a realização do teste da caneca telada, foi colhida, de todos os tetos que não apresentavam alterações visíveis no leite, uma amostra de 40 mL de leite em frascos esterilizados, específicos para colheita de leite, já contendo uma pastilha do conservante Bronopol<sup>1</sup>. Depois de colhido o leite, os frascos foram colocados em caixa de "isopor" com gelo, transportados para o laboratório, onde foi centrifugado a 2.000 rpm por cinco minutos, para a remoção da camada de gordura. Uma alíquota da fração desnatada foi acondicionada em microtubos tipo "eppendorf" de 1,5 mL e posteriormente estocada à temperatura de -20° C até o momento do uso.

### **4.2.2.2 Amostra de conjunto**

Terminada a ordenha e após a homogeneização do leite de conjunto armazenado no tanque de expansão, foi colhida uma amostra de 40

---

<sup>1</sup> (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) Broad Spectrum Microtabs II/D & F Control Systems, Inc.

mL de leite em frascos esterilizados, específicos para colheita de leite, contendo uma pastilha do conservante Bronopol. Os demais procedimentos de conservação, transporte e manipulação laboratorial foram iguais aos descritos anteriormente no item 4.2.1.1.

O segundo tipo de amostra de conjunto foi obtido no laboratório pela mistura de uma alíquota de 1 mL de cada amostra de leite individual, antes de ser centrifugado, obtendo-se uma nova amostra de conjunto para cada propriedade. Depois de agrupar as alíquotas, o procedimento adotado na manipulação laboratorial com cada amostra da mistura homogênea também foi idêntico ao descrito no item 4.2.1.1.

### 4.3 Teste sorológico

A detecção de anticorpos contra o vírus da BVD foi realizada pela técnica do ELISA no soro sanguíneo, conforme descrito por CHU et al. (1985) e HOWARD et al. (1985), e no leite desnatado, conforme descrito por NISKANEN et al. (1989), usando um "kit"<sup>2</sup> comercial de ELISA indireto. Esse mesmo "kit" foi utilizado para a análise das amostras de soro sanguíneo e para as amostras de leite desnatado, de acordo com as instruções do fabricante, e o procedimento adotado foi idêntico para todas, quais sejam: mesmo tempo para descongelamento, incubação, processo de lavagem das placas, dentre outros. As amostras foram analisadas em duplicata, e aquelas que apresentaram resultado suspeito foram retestadas.

#### 4.3.1 "kit" de ELISA

O "kit" utilizado para a realização do ELISA para a detecção de anticorpos contra o vírus da BVD continha os seguintes reagentes e material:

- dez microplacas com noventa e seis poços cada e revestidos com antígeno do vírus da BVD inativado Ag+, alternados com outros poços sem antígeno Ag-, conforme distribuição horizontal.
- um frasco contendo 4 mL de conjugado contra IgG de ruminante HRPO (horseradishperoxidase).

---

<sup>2</sup> CHEKIT BVD-SERO – Dr. BOMMELI AG / Liebefeld – Bern - Swiss

- um frasco contendo 2 mL de soro controle positivo de bovinos tendo como conservante 0,1% de azida sódica.
- um frasco contendo 2 mL de soro controle negativo de bovinos tendo como conservante 0,1% de azida sódica.
- quatro frascos contendo 100 mL cada de solução concentrada de lavagem e diluição para ser preparada na proporção de 1:10 no momento do uso.
- dois frascos contendo cada um 100 mL do substrato.
- um frasco contendo 100 mL da solução "stopping".

#### **4.3.2 Preparação das amostras e dos reagentes**

Os reagentes ficavam armazenados sob refrigeração (2° a 8°C). Todos os reagentes, assim como as microplacas, foram deixados à temperatura ambiente (18° a 25°C) por uma hora antes do início da manipulação. A solução de lavagem e diluição era preparada um pouco antes de sua utilização, sendo uma parte de concentrado para nove partes de água Milli Q e usada somente quando apresentava pH entre 5,5 e 6,0.

As amostras de soro sanguíneo e leite desnatado eram deixadas à temperatura ambiente por duas horas para descongelarem e poderem equilibrar à temperatura necessária para a manipulação.

**Tabela 1: Localização das diferentes propriedades selecionadas para o estudo e número de animais analisados por rebanho onde foram colhidas as amostras de leite e soro sanguíneo no período de março a junho de 2000.**

<b>Propriedade</b>	<b>Cidade</b>	<b>Estado</b>	<b>Nº de animais analisados</b>
1	Morro Agudo	SP	30
2	Morro Agudo	SP	20
3	Machado	MG	45
4	Jaboticabal	SP	29
5	Turvolândia	MG	70
6	Machado	MG	57
7	Poço Fundo	MG	48
8	Poço Fundo	MG	25
9	Ituverava	SP	28
10	Aramina	SP	24

**Tabela 2: Número de animais analisados para a pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD no leite e soro sanguíneo, de acordo com as regiões estudadas no período de março a junho de 2000.**

<b>Região</b>	<b>Número de animais analisados</b>
Sul de Minas Gerais	245
Nordeste de São Paulo	131
<b>TOTAL</b>	<b>376</b>

**Tabela 3: Número de amostras de soro sangüíneo, de leite individual e de leite de conjunto do tanque de expansão colhidas nas diferentes propriedades no período de março a junho de 2000.**

Propriedade	Amostras			Total
	Soro sangüíneo	Leite individual	Tanque de expansão	
1	30	30	01	61
2	20	20	01	41
3	45	45	01	91
4	29	29	01	59
5	70	70	01	141
6	57	57	01	115
7	48	48	01	97
8	25	25	01	51
9	28	28	01	57
10	24	24	01	49
Total	376	376	10	762

### **4.3.3 Manipulação das amostras e dos controles**

Os soros controles positivo e negativo, as amostras de soro sangüíneo e as de leite desnatado foram distribuídas de forma que cada uma fosse colocada no poço Ag+ e também no Ag-, sempre com análises em duplicata.

#### **4.3.3.1 Características de diluição das amostras de soro sangüíneo e controles**

A diluição das amostras de soro sangüíneo e dos controles era realizada na própria microplaca. Foram colocados 180  $\mu$ L da solução de lavagem e diluição dentro de cada poço para depois serem adicionados 20  $\mu$ L da amostra do soro sangüíneo ou dos soros controles dentro dos respectivos poços da placa. A diluição final da amostra de soro e de controles era de 1:10.

O conteúdo dos poços era homogeneizado com uma leve agitação manual da placa por um breve período. Depois dessa agitação, a microplaca era coberta e colocada em uma câmara úmida para incubação por noventa minutos à temperatura ambiente.

#### **4.3.3.2 Características de diluição das amostras de leite**

A diluição das amostras de leite desnatado também foi realizada na própria microplaca, porém com volume diferente do soro sanguíneo. Para o leite foram colocados 100  $\mu$ L da solução de lavagem e diluição dentro de cada poço, seguida da adição de 100  $\mu$ L da amostra de leite desnatado não diluído dentro dos respectivos poços da placa. A diluição final da amostra de leite era de 1:2.

Da mesma forma descrita no item anterior, o conteúdo dos poços foi homogeneizado com uma leve agitação da placa por um breve período. Após essa agitação, a microplaca era coberta e colocada na mesma câmara úmida já citada para incubação por noventa minutos à temperatura ambiente.

É importante observar que em uma mesma placa poderiam ser analisadas amostras de leite desnatado e soro sanguíneo, sendo que a diferença entre essas amostras era somente a diluição. A partir das fases seguintes o procedimento foi o mesmo para ambos os tipos de amostras.

#### **4.3.4 1ª Lavagem das placas**

Após o período de incubação todos os poços da microplaca, anteriormente preenchidos com leite ou soro, foram esvaziados completamente para em seguida serem preenchidos novamente com aproximadamente 300  $\mu$ L da solução de lavagem e diluição, sempre evitando a formação de bolhas de ar.



Este procedimento foi repetido por mais três vezes, e terminada a lavagem os poços eram esvaziados completamente.

#### **4.3.5 Adição do conjugado**

Antes da reação, o conjugado contra IgG de ruminante era diluído na proporção 1:200 na solução de lavagem e diluição. Em seguida eram adicionados, em cada poço, 200  $\mu$ L do conjugado diluído, para finalmente a microplaca ser coberta e incubada à temperatura ambiente em uma câmara úmida durante sessenta minutos.

#### **4.3.6 Adição do substrato**

Após a segunda lavagem das placas, como descrito anteriormente no item 4.3.4, foram adicionados em cada poço 200  $\mu$ L do substrato, que já estava equilibrado à temperatura ambiente.

#### **4.3.7 Adição da solução "stopping" e leitura dos resultados**

A leitura dos resultados foi realizada em uma leitora de microplacas para ELISA Labisystem Multiskan EX, num comprimento de onda de 405 nm. Para que fosse adicionada a solução "stopping" da reação do teste sorológico foi necessário fazer leituras prévias, até que a diferença entre os

valores de densidade óptica entre os controles positivo e negativo fosse igual a ou maior que 0,400. Primeiramente era obtida a diferença entre as densidades ópticas do poço Ag+ e do poço Ag- do soro controle positivo, assim como a diferença entre as densidades ópticas do poço Ag+ e do poço Ag- do soro controle negativo, para depois então ser obtida a diferença entre os controles.

Uma vez obtidos esses valores, se a diferença entre as densidades ópticas dos resultados dos controles positivo e negativo fosse igual a ou maior que 0,400, a reação era interrompida pela adição de 50 µL da solução "stopping" por poço, na mesma ordem em que foi adicionado o substrato, seguida pela leitura final dos resultados. O tempo transcorrido após a adição do substrato para que fosse adicionada a solução "stopping" variou de vinte a trinta minutos.

#### 4.3.8 Interpretação dos resultados

Na interpretação dos resultados, os valores considerados foram aqueles obtidos na última leitura após a adição da solução "stopping". As médias aritméticas das duplicatas foram calculadas, e os resultados dos controles e amostras foram calculados pela diferença dos valores das densidades ópticas dos poços Ag+ menos os valores obtidos nos poços Ag- :

Densidade óptica inicial do controle positivo (**DO<sub>i</sub>P**): (DO Ag+) – (DO Ag-)

Densidade óptica inicial do controle negativo (**DO<sub>i</sub>N**): (DO Ag+) – (DO Ag-)

Densidade óptica inicial das amostras [leite ou soro] (**DO<sub>i</sub>A**):(DOAg+)-(DOAg-)

Para a interpretação dos resultados de cada amostra, a DO<sub>i</sub> foi corrigida pela relação A/P. Esse valor foi obtido pela relação entre a diferença da densidade óptica inicial das amostras (DO<sub>i</sub>A) menos a densidade óptica inicial do controle negativo (DO<sub>i</sub>N) sobre a diferença da densidade óptica inicial do controle positivo (DO<sub>i</sub>P) menos a densidade óptica inicial do controle negativo (DO<sub>i</sub>N). A partir dessa relação, todos os valores, independentemente de terem sido obtidos ou não numa mesma análise em uma placa, foram padronizados e analisados conforme a relação abaixo:

$$\text{Valor final (\%)} = \frac{\text{DO}_i\text{A} - \text{DO}_i\text{N}}{\text{DO}_i\text{P} - \text{DO}_i\text{N}} \times 100$$

A interpretação final dos resultados foi feita a partir dos seguintes parâmetros:

#### Amostras de soro

VALOR FINAL	<30%	30-40%	>40%
INTERPRETAÇÃO	negativo	suspeito	positivo

### Amostras de leite

VALOR FINAL	<20%	20-30%	>30%
INTERPRETAÇÃO	negativo	suspeito	positivo

#### 4.4 Análise estatística

Para verificar a existência de correlação entre anticorpos contra o vírus da BVD presentes no soro sangüíneo e no leite originários do mesmo animal, os dados obtidos foram submetidos ao teste exato de Fischer. Na análise dos dados foram utilizados todos os resultados, quer fossem negativos, suspeitos ou positivos, das amostras de soro sangüíneo e leite individual. A esses resultados foram atribuídos escores: escore 0 (negativo), escore 1 (suspeito) e escore 2 (positivo), e a partir desses escores foi aplicado o teste exato de Fischer, correlacionando todas as amostras de soro sangüíneo e leite individual, independentemente da propriedade à qual pertencia a amostra, e também aplicado em cada propriedade separadamente. O modelo de como os cálculos foram efetuados estão representados no Quadro 1.

Para verificar o grau de associação entre a presença de anticorpos contra o vírus da BVD no soro sangüíneo e no leite individual foi aplicado, como complemento, o coeficiente de associação de Spearman. Como no teste anterior, esse coeficiente também foi aplicado em todas as amostras agrupadas, independentemente da propriedade, e em cada propriedade separadamente.

A correlação entre a proporção de animais soropositivos lactantes e anticorpos detectáveis contra o vírus da BVD no leite de conjunto do tanque de expansão foi expressa em porcentagem simples.

**Quadro 1: Esquema para cálculo do teste exato de Fischer, utilizando uma tabela de contingência do tipo 3X3, confrontando-se as variáveis negativa, suspeita e positiva (escores 0, 1 e 2, respectivamente) quanto à presença de anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de soro sanguíneo e leite individual de vacas provenientes das diferentes propriedades estudadas no período de março a junho de 2000.**

<i>Escore</i>	LEITE			Total
SORO	0	1	2	
0	a	b	c	a+b+c
1	d	e	f	d+e+f
2	g	h	i	g+h+i
<b>Total</b>	a+d+g	b+e+h	c+f+i	a+b+c+d+ e+f+g+h+i

Com base na presença ou ausência de anticorpos contra o vírus da BVD, as variáveis poderiam se comportar das seguintes formas:

a - freqüência de animais negativos no soro e negativos no leite.

b - freqüência de animais negativos no soro e suspeitos no leite.

c - freqüência de animais negativos no soro e positivos no leite.

d - freqüência de animais suspeitos no soro e negativos no leite.

e - freqüência de animais suspeitos no soro e suspeitos no leite.

f - frequência de animais suspeitos no soro e positivos no leite.

g - frequência de animais positivos no soro e negativos no leite.

h - frequência de animais positivos no soro e suspeitos no leite.

i - frequência de animais positivos no soro e positivos no leite.

## **5 RESULTADOS**

O questionário realizado nas propriedades procurou obter dados sobre as características das propriedades leiteiras e dos seus rebanhos, os cuidados efetuados quanto à sanidade, as alterações reprodutivas e a presença de sintomatologia clínica sugestiva de BVD nesses rebanhos. Todas as propriedades apresentavam seus animais semi-estabulados, e o tempo em que estavam na atividade leiteira variou de quatro a quarenta e dois anos (Tabela 4).

Na dependência da região, as propriedades apresentavam produções e manejos diferentes, e os rebanhos eram da raça holandesa preta e branca ou mestiços do cruzamento de holandês com raças zebuínas. Somente as propriedades 1 e 2 não possuíam ordenha mecânica, e as propriedades 7 e 8 não utilizavam a inseminação artificial. Quanto à assistência veterinária, as propriedades 4, 5, 6 e 7 tinham assistência freqüente, e nas demais o atendimento veterinário era solicitado ocasionalmente (Tabela 4).

As alterações reprodutivas mais freqüentes (abortos, repetições de cio e infecções uterinas) foram detectadas nas propriedades 1, 5, 7 e 9, porém não foi informado o nascimento de bezerros débeis, com alterações motoras ou más-formações congênitas em nenhuma das propriedades. A propriedade 8 foi a única que apresentou relato de um quadro clínico com sintomatologia sugestiva de BVD ocorrido há três anos, ocasião em que o animal veio a óbito (Tabela 4).

Em todas as propriedades foram encontrados animais reagentes para o teste realizado com as amostras de soro sangüíneo, cujas proporções variaram de 12,28 a 100,00%, num total de duzentos e quinze animais reagentes (57,18%) dos trezentos e setenta e seis analisados (Tabela 5). Para as amostras de leite individual, duas propriedades não apresentaram animais reagentes, e nas outras as proporções variaram de 5,26 a 70,83%, num total de noventa e oito animais reagentes (26,07%) dos trezentos e setenta e seis analisados (Tabela 6).

Na Figura 1 estão representadas as porcentagens de amostras positivas, negativas e suspeitas de soro sangüíneo e de leite individual de todas as propriedades agrupadas. Nota-se que a porcentagem de amostras positivas no soro sangüíneo é maior que a porcentagem de amostras negativas, ao contrário do que ocorre com as amostras de leite individual.

Na Tabela 7 são apresentadas as porcentagens de animais concordantes na detecção de anticorpos no soro sangüíneo e no leite individual, bem como a presença de anticorpos contra o vírus da BVD no leite

de conjunto do tanque de expansão e a relação entre a presença desses anticorpos e a proporção de animais lactantes reagentes. Nessa tabela nota-se que a porcentagem de animais concordantes na detecção de anticorpos no soro sanguíneo e leite individual variou de 0 a 70,83% e que foram detectados anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão nos rebanhos em que a concordância de animais que apresentaram anticorpos no soro sanguíneo e leite individual foi igual a ou maior que 32,14%. Também pode ser observado nessa tabela que anticorpos foram detectados no leite de conjunto nas propriedades 1, 5, 7 e 9, sendo que a porcentagem de animais reagentes no soro sanguíneo nessas propriedades foi igual a ou maior que 82,86%. No entanto, na propriedade 8, não foram detectados anticorpos no leite de conjunto, e a porcentagem de animais reagentes no soro sanguíneo foi de 84%. Nas demais propriedades, onde não foram detectados anticorpos no leite de conjunto, a porcentagem de animais reagentes no soro sanguíneo foi igual a ou menor que 28,89%.

Dos resultados obtidos nas duas regiões estudadas, do total de duzentos e quarenta e cinco amostras de soro sanguíneo provenientes da região Sul do Estado de Minas Gerais, cento e quarenta e uma (57,56%) foram reagentes, enquanto que na região Nordeste do Estado de São Paulo foram encontradas setenta e quatro (56,49%) amostras reagentes entre cento e trinta e uma analisadas (Tabela 8 e Figura 2). No que se refere ao leite individual, foram encontradas sessenta e nove (28,16%) amostras reagentes entre as duzentos e quarenta e cinco provenientes da região Sul do Estado de Minas



Gerais, e vinte e nove (22,14%) entre as cento e trinta e uma amostras pertencentes à região Nordeste do Estado de São Paulo (Tabela 9 e Figura 3).

De acordo com o teste de ELISA indireto utilizado, todos os resultados obtidos a partir de valores iniciais de densidade óptica foram corrigidos pela relação A/P, que homogeneiza os valores para se obter a interpretação final. Nas Tabelas 10 a 19 estão relacionados os valores das densidades ópticas corrigidas (DO) após a leitura das amostras de soro sanguíneo e leite individual, além das DOs das amostras de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea de cada propriedade.

As DOs das amostras de leite de conjunto do tanque de expansão e da mistura homogênea de todas propriedades estão apresentadas na Tabela 20. Nessa tabela nota-se que apenas as propriedades 5 e 7 tiveram diferenças maiores de DO conforme a amostra, porém não tiveram diferenças quanto à interpretação dos resultados; a propriedade 2 teve DO zero nos dois tipos de amostras, a propriedade 4 teve DO zero somente no tanque de expansão, e as demais propriedades apresentaram valores muito próximos de DO entre os dois tipos de amostras.

A análise estatística, através da aplicação do teste exato de Fischer, revelou que, ao agrupar todas as amostras independentemente da propriedade à qual pertencia, existiu uma dependência entre anticorpos presentes no soro sanguíneo e no leite, sendo dessa forma o resultado significativo ( $P < 0,01$ ). No entanto, a análise pelo coeficiente de associação de

Spearman revela que a associação entre anticorpos no soro sanguíneo e leite individual é fraca ( 0,537 ) (Tabela 21).

Na Tabela 21 também estão contidos todos os resultados obtidos nos testes estatísticos aplicados em cada propriedade separadamente. O teste exato de Fischer não foi aplicado nas propriedades 2, 9 e 10, pois os dados obtidos não eram passíveis de estabelecer uma correlação, porque em todas as amostras de leite individual das propriedades 2 e 10 não foram detectados anticorpos contra o vírus da BVD, enquanto que na propriedade 9 todas as amostras de soro sanguíneo eram reagentes. Nas propriedades 5, 6 e 7 existiu dependência entre anticorpos presentes no soro sanguíneo e leite individual ( $P < 0,01$ ), assim como na propriedade 3 ( $P < 0,05$ ). Já nas propriedades 1, 4 e 8 não existiu dependência entre os fatores analisados. O coeficiente de associação de Spearman foi aplicado somente nas propriedades em que o resultado do teste exato de Fischer foi significativo, a 5% na propriedade 3 ou 1% nas propriedades 5, 6 e 7. A associação entre anticorpos presentes no soro sanguíneo e no leite individual foi fraca nas propriedades 3 (0,467) e 5 (0,356), e média nas propriedades 6 (0,630) e 7 (0,619).

**Tabela 4: Características das propriedades e dos rebanhos, bem como os cuidados com a sanidade, presença de alterações reprodutivas e sintomatologia sugestiva de BVD nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.**

	PROPRIIDADE									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>CARACTERÍSTICAS</b>										
- tempo da atividade leiteira (anos)	20	06	15	10	04	20	12	42	07	10
- raça predominante	Mestiça	Mestiça	Mestiça	HPB	HPB	HPB	Mestiça	Mestiça	Mestiça	HPB
- regime de estabulação	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.	Semi-est.
- última aquisição de animais (meses)	08	60	NF	NF	01	36	12	60	02	NF
- tipo de ordenha	Manual	Manual	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica
- inseminação artificial (IA)/ cob. natural (CN)	IA/CN	IA	IA/CN	IA/CN	IA	IA	CN	CN	IA	IA
- assistência veterinária	ocasional	ocasional	freqüente	freqüente	freqüente	freqüente	freqüente	ocasional	ocasional	ocasional
- produção do rebanho	baixa	baixa	média	média	alta	alta	média	baixa	média	média
<b>SANIDADE</b>										
- vermifugação (aplicações/ano)	01	02	02	02	02	02	01	02	02	02
- controle de mastite	CMT	CMT	CMT	CMT	CMT	CMT	CMT	NF	NF	NF
- vacinas aplicadas										
- febre aftosa	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
- brucelose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
- carbúnculo sintomático	A	A	A	A	A	A	A	NA	NA	A
- leptospirose	NA	NA	NA	NA	A	NA	NA	NA	NA	NA
- raiva	NA	NA	A	NA	A	A	A	A	NA	NA
- outras	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS</b>										
- abortos (freqüência)	média	rara	rara	média	alta	rara	alta	média	rara	rara
- repetições de cio /"repeat breeders" (freq)	alta	rara	rara	rara	alta	rara	alta	rara	alta	rara
- infecções uterinas (freqüência)	alta	rara	rara	rara	média	rara	alta	rara	média	rara
- nascimento de bezerros fracos, débeis	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
- bezerros com más-formações	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<b>SINTOMATOLOGIA BVD</b>										
- relato sintomatologia sugestiva	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I	NI	NI
HPB – holandesa preta e branca	NA – não aplicada		NI – não informado			NF – não feita				
CMT – "California mastitis test"	A – aplicada		I - informado							

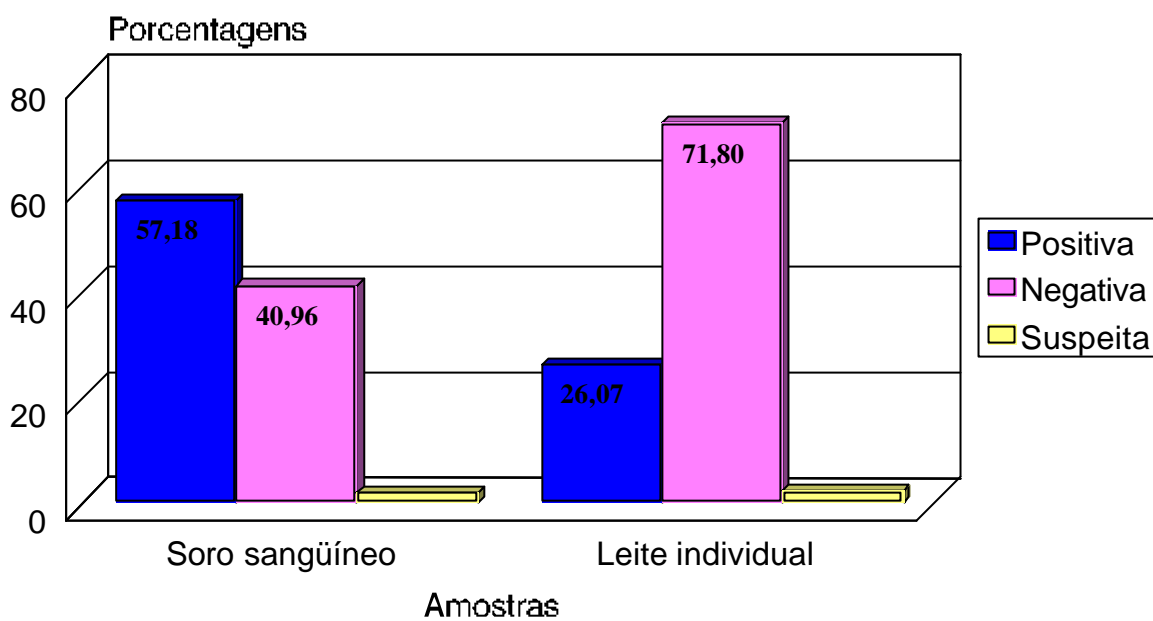
**Tabela 5: Número e percentagem de amostras de soro sanguíneo positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.**

Propriedade	Positiva		Negativa		Suspeita		Total	
	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%
1	29	96,67	01	03,33	00	00,00	30	100,00
2	05	25,00	15	75,00	00	00,00	20	100,00
3	13	28,89	30	66,67	02	04,44	45	100,00
4	08	27,59	17	58,62	04	13,79	29	100,00
5	58	82,86	12	17,14	00	00,00	70	100,00
6	07	12,28	50	87,72	00	00,00	57	100,00
7	42	87,50	06	12,50	00	00,00	48	100,00
8	21	84,00	04	16,00	00	00,00	25	100,00
9	28	100,00	00	00,00	00	00,00	28	100,00
10	04	16,67	19	79,17	01	04,16	24	100,00
Total	215	57,18	154	40,96	07	01,86	376	100,00

**Tabela 6: Número e percentagem de amostras de leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.**

Propriedade	Positiva		Negativa		Suspeita		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
1	18	60,00	10	33,34	02	06,66	30	100,00
2	00	00,00	20	100,00	00	00,00	20	100,00
3	04	08,89	41	91,11	00	00,00	45	100,00
4	02	06,90	27	93,10	00	00,00	29	100,00
5	24	34,28	43	61,43	03	04,29	70	100,00
6	03	05,26	54	94,74	00	00,00	57	100,00
7	34	70,83	12	25,00	02	04,17	48	100,00
8	04	16,00	21	84,00	00	00,00	25	100,00
9	09	32,14	18	64,28	01	03,58	28	100,00
10	00	00,00	24	100,00	00	00,00	24	100,00
Total	98	26,07	270	71,80	08	02,13	376	100,00

Figura 1: Representação gráfica das percentagens do total de amostras de soro sanguíneo e leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD em todas as propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.



**Tabela 7: Número e percentagem de animais reagentes no soro sanguíneo, no leite individual e percentagem de animais reagentes concordantes no soro sanguíneo e no leite individual submetidos ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD, assim como a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão, nas diferentes propriedades estudadas entre os meses de março e junho de 2000.**

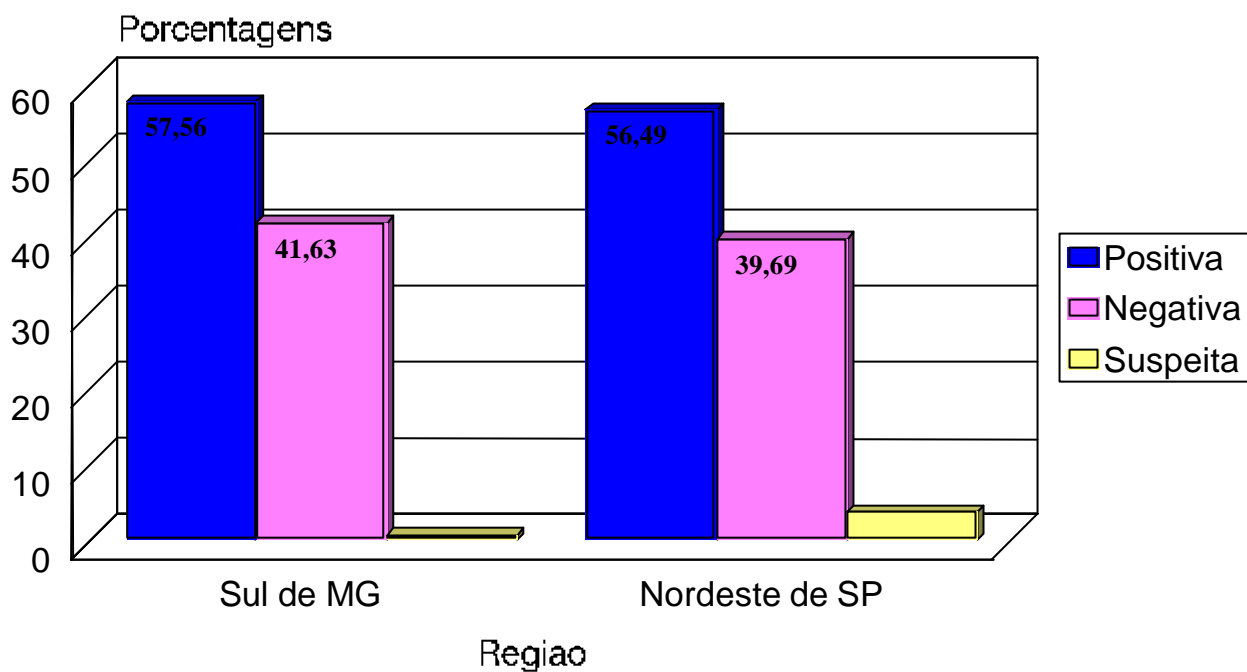
Propriedade	Nº total de animais analisados	Animais reagentes no soro sanguíneo		Animais reagentes no leite individual		% de animais reagentes no soro sanguíneo e no leite individual	Presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão
		nº	%	nº	%		
1	30	29	96,67	18	60,00	60,00	positivo
2	20	05	25,00	00	00,00	00,00	negativo
3	45	13	28,89	04	08,89	08,89	negativo
4	29	08	27,59	02	06,90	06,90	negativo
5	70	58	82,86	24	34,28	34,28	positivo
6	57	07	12,28	03	05,26	05,26	negativo
7	48	42	87,50	34	70,83	70,83	positivo
8	25	21	84,00	04	16,00	16,00	negativo
9	28	28	100,00	09	32,14	32,14	positivo
10	24	04	16,67	00	00,00	00,00	negativo

**Tabela 8: Número e porcentagem de amostras de soro sanguíneo positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000.**

Região	Positiva		Negativa		Suspeita		Total	
	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%
Sul de MG	141	57,56	102	41,63	02	00,81	245	100,00
Nordeste de SP	74	56,49	52	39,69	05	03,82	131	100,00
Total	215	57,18	154	40,96	07	01,86	376	100,00



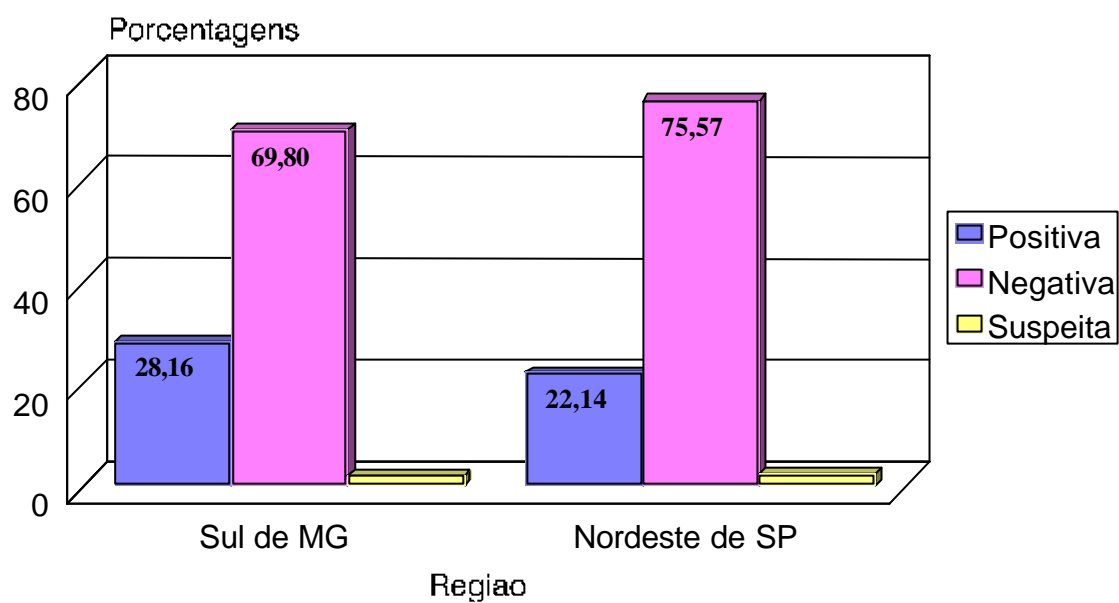
**Figura 2:** Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000.



**Tabela 9: Número e porcentagem de amostras de leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000.**

Região	Positiva		Negativa		Suspeita		Total	
	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%
Sul de MG	69	28,16	171	69,80	05	02,04	245	100,00
Nordeste de SP	29	22,14	99	75,57	03	02,29	131	100,00
Total	98	26,07	270	71,80	08	02,13	376	100,00

**Figura 3:** Representação gráfica das porcentagens de amostras de leite individual positivas, negativas e suspeitas submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD nas regiões estudadas entre os meses de março e junho de 2000.



**Tabela 10: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 1, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

<b>Animal</b>	<b>Soro sangüíneo</b>	<b>Leite</b>
1	0,248	0,141
2	0,666	0,153
3	0,819	0,723
4	0,682	0,048
5	0,998	1,290
6	0,841	0,108
7	0,985	0,255
8	0,843	0,167
9	1,035	0,414
10	0,890	0,487
11	0,964	0,460
12	0,921	0,738
13	0,780	0,095
14	0,721	0,321
15	0,825	0,153
16	0,786	0,314
17	0,661	0,184
18	0,827	0,337
19	0,661	0,402
20	0,856	0,509
21	0,773	0,610
22	0,820	0,113
23	0,649	0,000
24	0,956	0,808
25	0,622	0,250
26	0,610	0,437
27	1,050	1,080
28	0,920	0,970
29	0,861	0,423
30	0,664	0,325
Média	0,797	0,410
Tanque de expansão	-	0,568
Mistura homogênea	-	0,666

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 11: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 2, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

<b>Animal</b>	<b>Soro sangüíneo</b>	<b>Leite</b>
1	0,037	0,000
2	0,490	0,070
3	0,000	0,000
4	0,000	0,000
5	0,644	0,089
6	0,202	0,000
7	0,235	0,000
8	0,000	0,000
9	0,000	0,000
10	0,000	0,000
11	0,050	0,000
12	0,044	0,000
13	0,098	0,000
14	0,640	0,000
15	0,000	0,000
16	0,220	0,000
17	0,480	0,000
18	0,680	0,000
19	0,092	0,000
20	0,064	0,099
Média	0,198	0,012
Tanque de expansão	-	0,000
Mistura homogênea	-	0,000

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 12: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 3, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

Animal	Soro sangüíneo	Leite	Animal	Soro sangüíneo	Leite
1	0,288	0,000	25	0,891	0,111
2	1,140	0,000	26	0,000	0,000
3	0,374	0,020	27	0,000	0,000
4	0,166	0,000	28	1,001	0,196
5	0,110	0,000	29	0,040	0,000
6	0,233	0,000	30	0,160	0,000
7	0,598	0,030	31	0,065	0,000
8	1,042	0,727	32	0,194	0,000
9	0,109	0,000	33	0,280	0,014
10	0,000	0,040	34	1,012	0,303
11	0,060	0,000	35	0,000	0,000
12	0,030	0,057	36	0,288	0,000
13	0,236	0,000	37	0,160	0,000
14	0,216	0,000	38	0,329	0,000
15	1,054	0,310	39	0,388	0,111
16	0,080	0,000	40	0,620	0,000
17	0,177	0,000	41	0,125	0,000
18	0,062	0,000	42	0,000	0,000
19	0,200	0,000	43	0,926	0,000
20	0,630	0,000	44	0,744	0,030
21	1,029	0,600	45	0,070	0,000
22	0,000	0,090	Média	0,358	0,059
23	0,612	0,040	Tanque de expansão	-	0,130
24	0,285	0,000	Mistura homogênea	-	0,040

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 13: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 4, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

Animal	Soro sangüíneo	Leite
1	0,564	0,130
2	0,000	0,000
3	0,563	0,107
4	0,416	0,099
5	0,314	0,212
6	0,266	0,000
7	0,000	0,000
8	0,000	0,000
9	0,072	0,000
10	0,024	0,000
11	0,285	0,000
12	1,300	0,000
13	2,330	0,075
14	0,000	0,000
15	0,032	0,000
16	0,000	0,000
17	0,374	0,000
18	0,182	0,035
19	0,393	0,000
20	0,052	0,000
21	0,752	0,000
22	0,247	0,020
23	0,847	0,433
24	0,000	0,000
25	0,000	0,114
26	0,333	0,133
27	0,507	0,512
28	0,000	0,024
29	0,147	0,199
Média	0,344	0,072
Tanque de expansão	-	0,000
Mistura homogênea	-	0,111

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 14: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 5, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

Animal	Soro sangüíneo	Leite	Animal	Soro sangüíneo	Leite
1	0,560	0,682	38	0,658	0,344
2	0,880	0,155	39	1,680	0,685
3	1,800	0,040	40	0,175	0,000
4	1,990	0,443	41	0,975	0,080
5	1,220	0,131	42	1,327	0,518
6	0,990	0,130	43	0,853	0,000
7	1,430	0,264	44	1,111	0,369
8	1,210	0,000	45	1,211	0,353
9	1,510	0,451	46	0,810	0,000
10	0,264	0,000	47	0,875	0,080
11	0,658	0,376	48	0,148	0,000
12	0,410	0,193	49	0,884	0,051
13	0,497	0,065	50	0,631	0,285
14	0,519	0,000	51	1,090	1,062
15	1,160	0,000	52	0,000	0,000
16	1,760	0,340	53	1,224	0,741
17	1,680	0,191	54	0,837	0,441
18	1,530	0,097	55	1,110	0,000
19	1,670	0,480	56	1,470	0,077
20	0,256	0,000	57	1,850	0,555
21	1,270	0,046	58	0,000	0,000
22	2,550	0,434	59	0,971	0,150
23	0,190	0,058	60	0,155	0,000
24	0,274	0,000	61	0,285	0,074
25	1,730	0,000	62	0,861	0,087
26	1,940	0,087	63	1,114	0,345
27	1,410	0,092	64	0,594	0,000
28	2,280	0,074	65	0,795	0,470
29	1,330	0,105	66	0,168	0,052
30	1,820	0,043	67	1,134	1,258
31	0,714	0,144	68	1,055	0,485
32	2,080	0,418	69	1,481	0,537
33	0,555	0,091	70	0,557	0,286
34	0,635	0,034	Média	1,025	0,226
35	1,860	0,618	Tanque de expansão	-	0,330
36	0,165	0,000	Mistura homogênea	-	0,717
37	0,919	0,182			

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)



**Tabela 15: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 6, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

Animal	Soro sangüíneo	Leite	Animal	Soro sangüíneo	Leite
1	0,246	0,000	31	0,021	0,000
2	0,059	0,000	32	0,010	0,000
3	0,000	0,000	33	0,000	0,000
4	3,520	0,157	34	0,000	0,000
5	0,000	0,000	35	0,209	0,000
6	0,170	0,049	36	0,089	0,022
7	0,289	0,000	37	0,504	0,000
8	0,200	0,000	38	0,000	0,000
9	0,080	0,000	39	0,119	0,013
10	0,000	0,000	40	0,112	0,036
11	0,244	0,000	41	0,123	0,000
12	0,127	0,000	42	0,047	0,000
13	0,037	0,000	43	0,000	0,000
14	2,840	0,339	44	0,096	0,000
15	0,010	0,000	45	0,014	0,000
16	0,080	0,000	46	0,284	0,000
17	0,000	0,000	47	0,256	0,000
18	0,250	0,000	48	0,000	0,000
19	0,240	0,000	49	0,000	0,000
20	0,107	0,000	50	1,230	0,334
21	0,000	0,000	51	0,190	0,033
22	0,900	0,000	52	0,197	0,029
23	0,683	0,000	53	0,000	0,000
24	0,040	0,000	54	0,000	0,014
25	0,089	0,000	55	0,000	0,016
26	0,000	0,000	56	0,000	0,000
27	0,216	0,000	57	0,010	0,000
28	1,730	0,430	Média	0,281	0,026
29	0,123	0,000	Tanque de expansão	-	0,020
30	0,247	0,024	Mistura homogênea	-	0,019

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 16: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 7, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

Animal	Soro sangüíneo	Leite	Animal	Soro sangüíneo	Leite
1	1,014	0,510	27	0,985	0,720
2	0,959	0,160	28	0,957	1,330
3	1,003	0,600	29	0,617	0,000
4	1,034	0,470	30	0,090	0,000
5	1,010	0,370	31	0,929	0,310
6	0,170	0,000	32	0,040	0,000
7	1,032	1,180	33	0,884	0,660
8	0,993	0,510	34	0,943	0,270
9	0,998	0,640	35	0,274	0,000
10	1,012	0,660	36	0,959	0,460
11	0,601	0,000	37	0,617	0,370
12	1,042	0,690	38	0,866	0,710
13	1,025	1,260	39	1,006	0,590
14	1,000	0,000	40	0,996	1,720
15	1,039	0,780	41	1,010	1,112
16	0,992	0,610	42	1,010	0,900
17	0,992	0,140	43	0,655	0,600
18	0,040	0,020	44	0,981	0,370
19	0,222	0,000	45	0,970	0,710
20	1,061	0,550	46	1,018	1,480
21	0,998	0,600	47	1,039	0,280
22	1,015	1,510	48	0,909	1,200
23	0,896	0,310	Média	0,845	0,582
24	0,799	0,430	Tanque de expansão	-	0,500
25	0,854	0,120	Mistura homogênea	-	0,730
26	1,017	2,040			

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 17: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 8, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

<b>Animal</b>	<b>Soro sangüíneo</b>	<b>Leite</b>
1	0,830	0,199
2	0,500	0,125
3	0,770	0,140
4	0,420	0,020
5	0,990	0,425
6	1,780	0,106
7	0,190	0,000
8	2,120	0,094
9	0,550	0,137
10	1,550	0,644
11	0,670	0,064
12	0,620	0,010
13	0,750	0,000
14	1,220	0,304
15	0,770	0,040
16	1,170	0,027
17	0,450	0,013
18	0,880	0,120
19	0,070	0,000
20	0,140	0,000
21	0,430	0,000
22	1,200	0,394
23	1,260	0,000
24	0,290	0,000
25	0,820	0,077
Média	0,817	0,117
Tanque de expansão	-	0,077
Mistura homogênea	-	0,076

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 18: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 9, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

<b>Animal</b>	<b>Soro sangüíneo</b>	<b>Leite</b>
1	0,625	0,110
2	0,959	1,178
3	0,729	0,107
4	1,017	0,857
5	0,724	0,010
6	0,885	0,131
7	0,785	0,000
8	0,576	0,380
9	0,895	0,151
10	0,791	0,142
11	0,654	0,164
12	1,039	0,036
13	0,581	0,030
14	0,836	0,182
15	0,599	0,134
16	0,926	0,046
17	0,789	0,650
18	0,651	0,049
19	0,758	0,065
20	0,892	0,898
21	0,607	0,057
22	0,869	0,458
23	0,728	0,061
24	0,760	0,124
25	0,921	0,375
26	0,874	0,231
27	0,897	0,352
28	1,038	1,218
Média	0,800	0,292
Tanque de expansão	-	0,500
Mistura homogênea	-	0,517

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 19: Valores de DO das amostras individuais de soro sangüíneo e de leite, assim como os valores de DO das amostras do leite de conjunto do tanque de expansão e mistura homogênea da propriedade 10, submetidas ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD.**

<b>Animal</b>	<b>Soro sangüíneo</b>	<b>Leite</b>
1	0,972	0,134
2	0,876	0,195
3	0,216	0,080
4	0,195	0,000
5	0,252	0,000
6	1,153	0,080
7	0,244	0,000
8	0,307	0,000
9	0,073	0,010
10	0,000	0,000
11	0,000	0,000
12	0,182	0,000
13	0,034	0,000
14	0,064	0,000
15	0,011	0,000
16	0,079	0,000
17	0,265	0,000
18	0,344	0,070
19	0,815	0,090
20	0,264	0,000
21	0,151	0,000
22	0,063	0,020
23	0,299	0,056
24	0,268	0,000
Média	0,296	0,030
Tanque de expansão	-	0,000
Mistura homogênea	-	0,000

Interpretação dos resultados:

Soro sangüíneo : NEGATIVO (< 0,300), SUSPEITO (0,300-0,400), POSITIVO (>0,400)

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 20: Valores de DO e resultado final do teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de leite de conjunto das diferentes propriedades, colhidas no tanque de expansão ou obtidas a partir da mistura homogênea, entre os meses de março e junho de 2000.**

Propriedade	Tanque de expansão		Mistura homogênea	
	DO	Resultado final	DO	Resultado final
1	0,568	positivo	0,666	positivo
2	0,000	negativo	0,000	negativo
3	0,130	negativo	0,040	negativo
4	0,000	negativo	0,111	negativo
5	0,330	positivo	0,717	positivo
6	0,020	negativo	0,019	negativo
7	0,500	positivo	0,730	positivo
8	0,077	negativo	0,076	negativo
9	0,500	positivo	0,517	positivo
10	0,000	negativo	0,000	negativo

Interpretação dos resultados:

Leite: NEGATIVO (< 0,200), SUSPEITO (0,200-0,300), POSITIVO (>0,300)

**Tabela 21: Resultados das análises estatísticas aplicadas aos dados obtidos com as amostras de cada propriedade, bem como de todas as propriedades agrupadas, por meio do teste exato de Fischer e coeficiente de associação de Spearman para verificação da correlação entre anticorpos presentes no soro sanguíneo e leite individual das amostras colhidas nas diferentes propriedades no período de março a junho de 2000.**

Propriedade	Teste exato de Fischer	Coeficiente de associação de Spearman
1	0,400 <sup>NS</sup>	NA
2	NA	NA
3	0,015 <sup>*</sup>	0,467
4	0,084 <sup>NS</sup>	NA
5	7,94E <sup>-03**</sup>	0,356
6	1,20E <sup>-03**</sup>	0,630
7	1,16E <sup>-04**</sup>	0,619
8	1,00 <sup>NS</sup>	NA
9	NA	NA
10	NA	NA
Todas amostras	4,82E <sup>-31**</sup>	0,537

NA - dados não passíveis para estabelecer uma correlação

\*\* - significativo a 1%

\* - significativo a 5%

NS - Teste não significativo

## 6 DISCUSSÃO

Ao contrário das afirmações feitas por muitos profissionais ligados à pecuária bovina, que a BVD é uma doença exótica e que não ocorre no Brasil, o estudo realizado revelou que 57,18% das amostras de soro sanguíneo analisadas apresentaram anticorpos contra o vírus da BVD (Tabela 5). Por sua vez, essa ocorrência está de acordo com as estimativas de prevalência de anticorpos contra o vírus da BVD na população bovina adulta, feitas por NETLETON & ENTRICAN (1995), KRAMPS et al. (1999) e ZUIDHOF & MASON (2000). Da mesma maneira que no estudo realizado por RICHTZEINHAIN (1997), em todas as propriedades analisadas foram encontrados animais reagentes. Isso também coincide com a observação feita por NETLETON & ENTRICAN (1995), segundo a qual teoricamente todos os rebanhos bovinos estão infectados.

Nas duas regiões estudadas, a quantidade de animais reagentes nas análises de soro sanguíneo foi muito próxima (Tabela 8 e Figura 2). A ocorrência da infecção pelo vírus da BVD nos animais das propriedades localizadas na região Sul do Estado de Minas Gerais (57,56%) apresentou valores próximos àqueles encontrados por FIGUEIREDO et al. (1997) (61,47%) e por RICHTZEINHAIN (1997) (65%), sendo que essas pesquisas também foram desenvolvidas no Estado de Minas Gerais. Nas propriedades localizadas na região Nordeste do Estado de São Paulo, a ocorrência da infecção (56,49%)



apresentou valores intermediários àqueles encontrados por LANGONI et al. (1995) (39,50%) e RICHTZEINHAIN (1997) (78%), sendo essas pesquisas desenvolvidas no Estado de São Paulo.

As maiores ocorrências de animais reagentes no soro sanguíneo foram provenientes, na sua maioria, das propriedades em que os rebanhos eram mestiços, de manejo simples e de média e baixa produção de leite (propriedades 1, 7, 8 e 9). Nas quatro propriedades mais tecnificadas, com maiores produções e com rebanhos mais aprimorados geneticamente (propriedades 4, 5, 6 e 10), somente a propriedade 5 apresentou uma ocorrência maior de animais reagentes no soro sanguíneo. Isso mostra que a infecção pode ser encontrada em qualquer tipo de rebanho, independentemente de raça, manejo e produção.

Entre os quesitos abordados no questionário demonstrado na Tabela 4, algumas das propriedades apresentaram dados sugestivos da presença da infecção, bem como o provável meio pelo qual a infecção tenha entrado no rebanho. Nota-se que, com exceção da propriedade 8, nas demais propriedades em que a ocorrência de animais reagentes no soro sanguíneo foi alta, respectivamente propriedades 1, 5, 7 e 9, foram adquiridos animais recentemente. Esses animais podem ter introduzido o vírus no rebanho, eram animais PI ou gestantes de bezerros PI, conforme citação feita por ZUIDHOF & MASON (2000), ou segundo MOERMAN et al. (1993), o vírus circulante pode ser oriundo de bovinos transitoriamente virêmicos e não necessariamente de bovinos PI.

O vírus também pode ter sido introduzido pela inseminação artificial (HOUE, 1995; FRAY et al., 2000) ou até mesmo pelo touro, já que algumas das propriedades utilizavam somente a cobertura natural ou até mesmo as duas formas. A propriedade 7 foi uma daquelas que somente utilizava a cobertura natural, e o touro era de uso comum com a propriedade vizinha, e dessa forma esse touro possivelmente poderia ter um papel importante na disseminação do vírus.

Entretanto, segundo ELLIS et al. (1995) e FLORES (1997), os maiores problemas causados pela BVD estão relacionados à esfera reprodutiva. O comprometimento do desempenho reprodutivo (NISKANEN et al., 1995), principalmente quanto à ocorrência de repetições de cio, abortos e infecções uterinas, foi verificado nas propriedades que apresentaram maior quantidade de animais reagentes no soro sanguíneo (propriedades 1, 5, 7 e 9). As repetições de cio foram as principais reclamações feitas pelos proprietários, que nos casos da BVD são resultantes da infecção no período da pré-implantação do zigoto e até mesmo nos primeiros meses de gestação (FRAY et al., 2000), ou provenientes de sêmen infectado pelo vírus da BVD (MOENNIG & LIESS, 1995).

Também nessas propriedades foram relatadas as maiores ocorrências de aborto, sendo que a infecção pelo vírus da BVD pode ocasionar aborto em qualquer fase da gestação (LARSON, 1996). Em nenhuma propriedade foi registrado o nascimento de bezerros fracos, débeis, prematuros e natimortos. No entanto estes nascimentos podem até ter acontecido, porém não tiveram atenção dos proprietários e provavelmente não foram levados ao

conhecimento do médico veterinário, já que, principalmente nas propriedades 1 e 9, a assistência veterinária era solicitada ocasionalmente.

Com referência às análises do leite individual (Tabela 6), foi verificado que a quantidade de amostras reagentes foi menor do que as do soro sangüíneo, conforme demonstrado na Figura 1. Esses resultados atestam as afirmativas feitas por KLINTEVALL et al. (1991), SCHRIJVER & KRAMPS (1998) e KRAMPS et al. (1999), que a quantidade de imunoglobulinas no leite é bem menor do que no soro sangüíneo, além do fato de que a determinação da presença de anticorpos contra o vírus da BVD no soro sangüíneo é mais sensível e específica do que no leite (NISKANEN et al., 1989). Todas as amostras reagentes no leite individual eram provenientes de animais também reagentes no soro sangüíneo, o que indica possivelmente a ausência de reações falso-positivas no leite, que poderiam ser causadas por mastite ou resíduos de gordura (KLINTEVALL et al., 1991), já que o leite foi colhido de quartos que não apresentavam mastite clínica e foi submetido à centrifugação e diluição conforme instrução do fabricante do "kit".

A correlação existente entre a proporção de animais lactantes reagentes e a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão revelou que anticorpos foram detectados nas propriedades em que a proporção de animais reagentes foi igual a ou maior que 82,86% no soro sangüíneo e igual a ou maior que 32,14% no leite individual (Tabela 7). Esses resultados obtidos diferem daqueles encontrados por NISKANEN et al. (1991), que detectaram anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão em

propriedades em que a quantidade de animais reagentes no soro sanguíneo foi igual a ou maior que 4%. Entretanto, NISKANEN (1993) e FREDRISKEN et al. (1998a) afirmaram que poucos animais com altos títulos de anticorpos no leite seriam suficientes para que fossem detectados anticorpos no leite de conjunto.

Nas demais propriedades em que não foram detectados anticorpos no leite do tanque de expansão, com exceção da propriedade 8, a quantidade de animais reagentes foi igual a ou menor que 28,89% no soro sanguíneo e igual a ou menor que 8,89% no leite individual (Tabela 7), e nessas propriedades não foram verificadas alterações no desempenho reprodutivo dos rebanhos ou qualquer característica que pudesse ser atribuída à infecção pelo vírus da BVD. Esses achados reforçam a afirmação feita por NISKANEN (1993), segundo a qual nos rebanhos em que a amostra de leite do tanque de expansão não contém anticorpos é improvável que o vírus da BVD esteja causando infecção nos animais.

A propriedade 8 comportou-se de maneira diferente, pois apresentou 84% de animais reagentes no soro sanguíneo e somente 16% de reagentes no leite individual, e não foram detectados anticorpos no leite do tanque de expansão. Nesse caso a hipótese mais provável é explicada por (NISKANEN, 1993), segundo a qual a fonte de infecção poderia ter sido debelada do rebanho, não havendo portanto mais a infecção ativa. É importante salientar que nessa propriedade ocorreu um quadro clínico sugestivo de BVD e que o animal veio a óbito. É possível que esse animal poderia ter sido a fonte de infecção no rebanho, e os demais bovinos após

infectados apresentaram anticorpos no soro sangüíneo por um longo período após a infecção ter cessado (DUFFELL & HARKNESS, 1985; SANDVIK, 1999; FREDRISKEN et al., 1999), porém para o leite do tanque de expansão os anticorpos gradativamente diminuíram, até tornarem ausentes (LINDBERG & ALENIUS, 1999).

Comparando as proporções entre animais reagentes no soro sangüíneo e reagentes no leite individual, foi verificado que existiram diferenças conforme a propriedade analisada. Enquanto a propriedade 7 apresentou proporções muito próximas de amostras reagentes no soro sangüíneo e no leite individual, respectivamente 87,50% e 70,83%, a propriedade 8 apresentou 84,00% de amostras reagentes no soro sangüíneo e 16,00% no leite individual. Outro exemplo contrastante foi a propriedade 6, em que a quantidade de animais reagentes no soro sangüíneo foi 12,28%, e no leite individual, 5,26%, e a propriedade 2 apresentou 25% de reagentes no soro sangüíneo e nenhuma amostra de leite individual reagente. Essas diferenças entre as proporções sugerem que nas propriedades em que a proporção de animais reagentes no leite individual é maior, esses animais estão sofrendo infecção ativa ou são convalescentes (LINDBERG & ALENIUS, 1999).

Quando analisadas as DOs das amostras de soro sangüíneo e leite individual dos animais de cada propriedade, foi verificado que nas propriedades 2 e 10, respectivamente Tabelas 11 e 19, praticamente todos os animais apresentaram valores baixos de DOs, principalmente nas amostras de leite individual. Uma possível explicação seria que os animais que foram reagentes

nas amostras de soro sangüíneo devem ter sido infectados há vários anos, e nesse caso, para que seja reforçada essa suposição, seria necessário conhecer a idade desses animais, pois dessa forma esses rebanhos poderiam estar relacionados à fase E do ciclo de infecção pelo vírus da BVD estabelecido por HOUE (1999), na qual os animais PI teriam sido removidos há vários anos dos rebanhos.

Para a propriedade 6 poderia ser atribuído o mesmo raciocínio. No entanto, nessa propriedade foram detectados três animais reagentes na amostra de leite individual, sendo que as respectivas amostras de soro sangüíneo apresentaram altos valores de DO (Tabela 15). Baseando-se nesses valores de DO encontrados nessas amostras citadas e correlacionando-os com as afirmações da presença de anticorpos contra o vírus da BVD ao longo do tempo no soro sangüíneo (DUFFELL & HARKNESS, 1985; SANDVIK, 1999; FREDRISKEN et al., 1999) e no leite (LINDBERG & ALENIUS, 1999), esse rebanho provavelmente poderia ter sido recentemente infectado, porém sem a presença de animais PI, e estaria relacionado à fase A do ciclo de infecção estabelecido por HOUE (1999).

Pode ser cogitado que as propriedades 3 e 4 também estariam nessa fase A, porém a quantidade de animais reagentes no soro sangüíneo e não reagentes no leite individual nessas propriedades foi maior (Tabelas 12 e 13) do que na propriedade 6. Uma hipótese a ser aventada seria que nesses rebanhos estivesse ocorrendo uma segunda infecção após um período em que

os animais não tiveram mais contato com o vírus, ou seja, o vírus foi eliminado do rebanho após a ocorrência da primeira infecção.

Em contrapartida, as propriedades 1 e 7 apresentaram altos valores de DO nas amostras de soro sanguíneo e, principalmente a propriedade 7, nas amostras de leite individual (Tabelas 10 e 16). Essa situação sugere que essas propriedades possuíam animais PI que estariam há algum tempo disseminando o vírus, e considerando as cinco fases do ciclo de infecção de HOUE (1999), estariam relacionadas à fase C.

Nas propriedades 5, 8 e 9 foram detectados altos valores de DO nas amostras de soro sanguíneo (respectivamente Tabelas 14, 17 e 18). Entretanto, no leite individual, uma grande quantidade de amostras apresentavam valores menores de DO, o que conseqüentemente definiu o resultado do teste como não reagente. Quando analisadas essas propriedades separadamente, a propriedade 8, que já foi discutida anteriormente, poderia ser classificada como estando na fase E, em que os animais PI foram removidos há alguns anos. A propriedade 9, por sua vez, provavelmente estaria na fase C, porque mais de 90% dos seus animais foram reagentes no soro sanguíneo. Entretanto, no presente estudo, somente foram utilizadas as vacas em lactação, não tendo a realidade de quantos animais eram reagentes em todo o rebanho.

Referindo-se ainda à propriedade 9, a proporção de amostras reagentes no leite individual, apresentada por essa propriedade, foi menor quando comparada com a propriedade 7, em que as proporções de amostras reagentes encontradas no soro sanguíneo e no leite individual foram altas e de

valores próximos. Considerando as afirmações, já citadas anteriormente, feitas por DUFFELL & HARKNESS (1985), SANDVIK (1999), FREDRISKEN et al. (1999) e LINDBERG & ALENIUS (1999), sobre a detecção de anticorpos no soro sanguíneo e no leite ao longo do tempo, também pode ser sugerido que essa propriedade poderia estar relacionada à fase D do ciclo de infecção, na qual o rebanho foi infectado, e os animais PI teriam sido removidos recentemente.

Na propriedade 5 poderiam ser atribuídas as mesmas sugestões e alternativas, as quais foram aplicadas à propriedade 9, de qual fase do ciclo de infecção estaria relacionada. Nesse caso poderia ser feita ainda uma terceira suposição: nessa propriedade os animais, na sua maioria, apresentavam alta produção de leite, e segundo NISKANEN et al. (1989), os títulos de anticorpos diminuem à medida que a produção de leite do animal aumenta. Com isso muitos dos valores de DO obtidos nas amostras de leite seriam conseqüentemente menores, devido à maior produção de leite pelo animal.

As análises estatísticas realizadas para a verificação da correlação existente entre anticorpos contra o vírus da BVD presentes no soro sanguíneo e leite individual (Tabela 21) também comprovam essas diferenças encontradas nas proporções de animais reagentes nas duas amostras. Ao aplicar o teste exato de Fischer, em todas as amostras agrupadas independentemente da propriedade, existiu correlação entre a presença de anticorpos no soro sanguíneo e no leite individual. No entanto, quando o teste foi aplicado nas amostras conforme a propriedade, os resultados encontrados foram diferentes,



pois cada propriedade comportou-se de maneira singular, não havendo assim uma correlação efetiva entre os resultados apresentados pelas propriedades.

A análise das amostras de leite de conjunto mostrou que ocorreram diferenças entre os valores de DOs entre os dois tipos de amostras. As maiores diferenças foram encontradas nas propriedades 5 e 7 (Tabela 20). No caso da propriedade 5 somente 34,28% dos animais analisados apresentavam anticorpos no leite individual, e a DO da amostra do leite do tanque de expansão foi 0,330. Ao analisar a amostra proveniente da mistura homogênea, o valor de leitura da DO aumentou para 0,717. O mesmo ocorreu na propriedade 7, em que a DO foi 0,500 e 0,730, respectivamente DO da amostra do tanque de expansão e DO da mistura homogênea. Se a mistura homogênea foi obtida de volumes iguais de leite de cada animal e o valor de DO foi maior, pode-se cogitar que os animais que tivessem maiores títulos de anticorpos apresentavam menores produções de leite, pois conforme citação de NISKANEN et al. (1989), já mencionada anteriormente, os títulos de anticorpos diminuem à medida que a produção de leite aumenta após o parto. Portanto nesse tipo de amostra provavelmente abrandou-se o efeito da produção individual.

Portanto, no geral, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a BVD consiste em mais um problema com o qual os pecuaristas brasileiros têm de conviver. Tanto é que FREDRISKEN et al. (1998a) afirmou que depois da mastite, é a BVD que causa as maiores perdas econômicas nos rebanhos leiteiros em muitos países. Entretanto, como os pecuaristas deveriam enfrentar

o problema? Considerando a heterogeneidade dos rebanhos bovinos nacionais em todos os sentidos e principalmente a falta de uma política sanitária bem definida pelo governo brasileiro na pecuária, torna-se extremamente complicado encontrar uma solução efetiva.

Adotar medidas de controle semelhantes às medidas adotadas nos países escandinavos (BITSCH & RONSHOLT, 1995), seria praticamente impossível dentro da realidade nacional. Identificar o animal PI seria uma alternativa viável para alguns rebanhos mais aprimorados, embora ainda exista o risco da infecção surgir novamente, quer seja na possibilidade do nascimento de bezerros PI, na presença da fonte de infecção nos rebanhos vizinhos e na transmissão por meio do contato indireto. A vacinação pode ser o meio mais vantajoso para controlar essa situação, conforme afirmação de DEREGT & LOEWEN (1995), porém é importante ressaltar que essas vacinas devem ser eficazes (VAN OIRSCHOT et al., 1999). Isso porque existe o agravante de que, segundo BOTTON et al. (1998), algumas estirpes isoladas no Brasil são pouco neutralizadas pelos anticorpos contra estirpes de referência internacional, além do isolamento do genótipo II do vírus da BVD no Brasil (CANAL et al., 1998), já que, das vacinas disponíveis no mercado nacional, praticamente todas são importadas e somente contêm o genótipo I do vírus da BVD.

Entretanto, mesmo com as dificuldades encontradas, o problema não deve ser deixado de lado. Antes de tomar alguma atitude é necessário realizar o diagnóstico de situação dos rebanhos, ponto inicial em que se torna interessante a utilização de amostras de leite de conjunto do tanque de

expansão, para que se tenha pelo menos um parâmetro para o início das investigações (NISKANEN, 1993). A utilização desse tipo de amostra apresenta várias vantagens do ponto de vista econômico e prático (KLINTEVALL et al., 1991; HARTMAN et al., 1997; VAN OIRSCHOT, 1998; PATON et al., 1998; LINDBERG & ALENIUS, 1999), e por ser um indicador de infecção ativa nos rebanhos (HOUE & PALFI, 1993), fornece a evidência indireta da presença de animais PI no rebanho (HOUE, 1999).

Por fim, o presente estudo mostrou que a amostra de leite de conjunto do tanque de expansão pode acusar a presença de animais reagentes. Mas como existem vários fatores que podem interferir, tais como estágio de infecção dos animais no rebanho, produção individual de leite, período de lactação e presença do animal PI no rebanho, é necessário um cuidado especial na interpretação dos resultados. Tudo isso direciona para o desenvolvimento de outras pesquisas que possam diminuir todas essas dúvidas.

## 7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente trabalho, em que foram pesquisados anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de soro sangüíneo, de leite individual e de leite de conjunto, permitiu as seguintes conclusões:

1. A infecção foi constatada em todos os rebanhos analisados, tanto na região Sul do Estado de Minas Gerais como na região Nordeste do Estado de São Paulo.
2. Do total de animais reagentes no soro sangüíneo, menos da metade desses animais foi reagente no leite individual.
3. O leite do tanque de expansão foi indicativo da presença da infecção quando o rebanho apresentou uma proporção igual a ou maior que 82,86% de animais reagentes no soro sangüíneo.
4. As diferentes amostras de leite de conjunto, a primeira colhida do tanque de expansão e a segunda obtida de forma homogênea não apresentaram diferenças na interpretação dos resultados. No entanto, pelos valores de DOs obtidos nas amostras do tanque de expansão, em algumas propriedades ocorreu a interferência das produções individuais de leite dos animais.
5. Nas duas regiões estudadas a ocorrência da infecção pelo vírus da BVD foi proporcionalmente similar.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>3</sup>

AMES, T.R.; BAKER, J.C. Management practices and vaccination programs that help control BVD virus infection. *Veterinary Medicine*, v.85, n.10, p.1.140-1.149, 1990.

BAKER, J.C. Bovine viral diarrhea virus: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.190, n.11, p.1.449-1.458, 1987.

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

BENNETT, R.M.; CHRISTIANSEN, K.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Modelling the impact of livestock disease on production: case studies of non notifiable diseases of farm animals in Great Britain. *Animal Science*, v.68, p.681-689, 1999.

BEZEK, D.M.; MECHOR, D. Identification and eradication of bovine viral diarrhea virus in a persistently infected dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.201, n.4, p.580-586, 1992.

BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of Bovine Viral Diarrhea Virus infection - a window on the pathogenesis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.11, n.3, p.447-475, 1995.

BITSCH, V.; RONSHOLT, L. Control of Bovine Viral Diarrhea virus infection without vaccines. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.11, n.3, p.627-640, 1995.

BIUK-RUDAN, N.; CVETNIC, S.; MADIC, J.; RUDAN, D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology*, v.51, p.875-881, 1998.

BOCK, R.E.; BURGESS, G.W.; DOUGLAS, I.C. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of bovine serum antibody to bovine viral diarrhoea virus. *Australian Veterinary Journal*, v.63, n.12, p.406-408, 1986.

BOLIN, S.R. The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. *Veterinary Medicine*, v.85, n.10, p.1.124-1.132, 1990.

---

<sup>3</sup> Segundo ABNT NRB 6023, Agosto/2000

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, n.6, p.755-759, 1995.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. The clinical significance of genetic variation among bovine viral diarrhoea viruses. *Veterinary Medicine*, 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*, v.12, n.2, p.461-469, 1993.

BOTTON, S.A.; SILVA, A.M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.31, n.11, p.1.429-1.438, 1998.

BRASIL. MAARA (Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Defesa Sanitária Animal). Programa de controle e erradicação da peste suína clássica: manual de procedimentos. Brasília, 1992.

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

CANAL, C.W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.63, n.2-4, p.85-97, 1998.

CHO, H.J.; MASRI, S.A.; DEREGT, D.; YEO, S.; THOMAS, E.J.G. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked-immunosorbent-assay for the detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus antibody in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.55, n.1, p.56-59, 1991.

CHU, H.J.; ZEE, Y.C.; ARDANS, A.A.; DAI, K. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bovine sera. *Veterinary Microbiology*, v.10, p.325-333, 1985.

CORTESE, V.S.; WEST, K.H.; HASSARD, L.E.; CARMANS, S.; ELLIS, J.A. Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type II isolate of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.213, n.9, p.1.312-1.319, 1998.

DEREGT, D.; LOEWEN, K.G. Bovine Viral Diarrhea virus - biotypes and disease. *Canadian Veterinary Journal*, v.36, n.6, p.371-378, 1995.

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

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

DUFFELL, S.J.; HARKNESS, J.W. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Veterinary Record*, v.117, p.240-245, 1985.

DURHAM, P.J.K.; HASSARD, L.E. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, v.22, p.1-10, 1990.

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

ELLIS, J.A.; MARTIN, K.; NORMAN, G.R.; HAINES, D.M. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, p.433-436, 1995.

FERRARI, G.; SCICLUNA, M.T.; BONVICINI, D.; GOBBI, C.; DELLA VERITÀ, F.; VALENTINI, A.; ANTORINO, G.L. Bovine virus diarrhoea(BVD) control programme in an area in the Rome province (Italy). *Veterinary Microbiology*, v.64, p.237-245, 1999.

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

FLORES, E.F. Problemas reprodutivos em bovinos causados pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.3, p.57-61, 1997.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; GIL, L.H.V.G.; TOBIAS, F.L.; LIMA, M.; GARCEZ, D.C.; BOTTON, S.A. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.1, p.11-17, 2000.

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*, v.60, n.61, p.615-627, 2000.

FREDRIKSEN, B.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S.A. The duration of antibodies against bovine virus diarrhoea virus in bulk milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.39, n.1, p.89-98, 1998a.

FREDRIKSEN, B.; ODEGAARD, S.A.; LOKEN, T. The effect of bovine virus diarrhoea virus on reproduction in recently infected Norwegian dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.39, n.1, p.99-108, 1998b.

FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S.A. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record*, v.144, p.111-114, 1999.

GROM, J.; BARLIC-MAGANJA, D. Bovine viral diarrhoea (BVD) infections-control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.259-264, 1999.

GROOMS, D.L.; BROCK, K.V.; WARD, L.A. Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhoea virus vaccine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.10, p.130-134, 1998.

GUNN, H.M. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Record*, v.132, n.5, p.584-585, 1993.

HARTMAN, A.; VAN WUIJCKHUISE, L.; FRANKENA, K.; FRANKEN, P.; WEVER, P.; DE WIT, J.; KRAMPS, J. Within-herd BHV-1 prevalence prediction from an ELISA on bulk milk. *Veterinary Record*, v.140, n.3, p.484-485, 1997.

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 diarrhoea virus infection in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.202, n.11, p.1.849-1.854, 1993.

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

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

HOUE, H.; PALFI, V. Estimation of herd incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in herds previously without animals persistently infected with BVDV. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.34, n.2, p.133-137, 1993.



HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; BROWNLIE, J. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Veterinary Microbiology*, v.10, p.359-369, 1985.

HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; BROWNLIE, J. Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus of passively acquired antibody. *Veterinary Microbiology*, v.19, p.195-203, 1989.

JUSTEWICZ, D.M.; MAGAR, R.; MARSOLAIS, G.; LECOMTE, J. Bovine viral diarrhoea virus-infected MDBK monolayer as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of antibodies in bovine sera. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.14, p.377-384, 1987.

KLINTEVALL, K.; NÄSLUND, K.; SVEDLUND, G.; HAJDU, L.; LINDE, N.; KLINGEBORN, B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *Journal of Virological Methods*, v.33, p.319-333, 1991.

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 diarréia 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*, v.64, p.135-144, 1999.

KREUTZ, L.C.; DONIS, R.; GIL, L.H.V.; LIMA, M.; HOFFMAN, A.N.; GARCEZ, D.C; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, n.12, p.1.459-1.466, 2000.

LANGONI, H.; PAES, A.C.; TONIN, F.B.; SILVA, A.V.; DENARDI, M.B. Prevalence of BVD, IBR and PI3 in bovine by ELISA test. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 5., 1995, Ribeirão Preto. Resumos... Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Virologia, 1995. N.B43.

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

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

LUZZAGO, C.; PICCININI, R.; ZEPPONI, A.; ZECCONI, A. Study on prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in 29 Italian dairy herds with reproductive problems. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.247-252, 1999.

MARS, M.H.; BRUSCHKE, C.J.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Airborne transmission of BHV1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Veterinary Microbiology*, v.66, n.3, p.197-207, 1999.

McGOWAN, M.R.; KIRKLAND, P.D.; RODWELL, B.J.; KERR, D.R.; CARROLL, C.L. A field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus infection around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology*, v.39, p.443-449, 1993.

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

MOERMAN, A.; STRAVER, P.J.; JONG, M.C.M.; QUAK, J.; BAANVINGER, T.; VAN OIRSCHOT, J.T. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Veterinary Record*, v.132, p.622-626, 1993.

MUVAVARIRWA, P.; MUDENGE, D.; MOYO, D.; JAVANGWE, S. Detection of bovine-virus-diarrhoea-virus antibodies in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.62, p.241-244, 1995.

NETTLETON, P.F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses-review. *British Veterinary Journal*, v.151, n.6, p.615-642, 1995.

NISKANEN, R. Relationship between the levels of antibodies to Bovine Viral Diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Veterinary Record*, v.133, n.14, p.341-344, 1993.

NISKANEN, R.; ALLENIUS, S.; LARSSON, B.; JUNTTI, N. Evaluation of a enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v.36, p.113-118, 1989.

NISKANEN, R.; ALLENIUS, S.; LARSSON, B.; JACOBSSON, S.O. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a

tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Archives of Virology*, suppl. 3, p.245-251, 1991.

NISKANEN, R.; EMANUELSON, V.; SUNDBERG, J.; LARSSON, B.; ALENIOUS, S. Effects of infection with Bovine Virus Diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. *Preventive Veterinary Medicine*, v.23, n.3-4, p.229-237, 1995.

NUOTIO, L.; JUVONEN, M.; NEUVONEN, E.; SIHVONEN, L.; HUSU-KALLIO, J. Prevalence and geographic distribution of bovine viral diarrhoea (BVD) infection in Finland 1993-1997. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.231-235, 1999.

OBANDO, C.; BAULE, C.; PEDRIQUE, C.; VERACIERTA, C.; BELÁK, S.; MERZA, M.; MORENO-LOPEZ, J. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.40, n.3, p.253-262, 1999.

OLAFSON, P.; MAcCALLUM, A.D.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Veterinarian*, v.36, p.104-108, 1946.

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

PAISLEY, L.G.; WELLS, S.; SCHMITT, B.J. Prevalence of bovine viral diarrhoea antibodies in 256 U.S. cow-calf operations: a survey. *Theriogenology*, v.49, p.1.313-1.323, 1996.

PATON, D.J.; CHRISTIANSEN, K.H.; ALENIOUS, S.; CRANWELL, M.P.; PRITCHARD, G.C.; DREW, T.W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Veterinary Record*, v.142, n.11, p.385-391, 1998.

PERDRIZET, J.A.; REBHUN, W.C.; DJBOVI, E.J.; DONIS, R.O. Bovine Virus Diarrhoea-clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Veterinarian*, v.77, n.1, p.46-74, 1987.

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. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.11, n.3, p.501-520, 1995.

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

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

RIDPATH, J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2, detection and vaccination. Disponível em <<http://www.usaha.org/speeches/speech98>>. Acesso em: 5 jan. 2000.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, v.205, n.1, p.66-74, 1994.

ROEHE, P.M.; OLIVEIRA, E.A.S.; OLIVEIRA, L.G.; MUÑOZ, J.C.P. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no país. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPERVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. *Anais...* p. 39-48.

ROEHE, P.M.; WEIBLEN, R. IBR e BVD: perguntas e respostas mais comuns. *A Hora Veterinária*, v.20, n.116, p.69-73, 2000.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.123-134, 1999.

SCHRIJVER, R.S.; KRAMPS, J.A. Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent formats. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.17, n.2, p.550-561, 1998.

SUDHARSHANA, K.J.; SURESH, K.B; RAJASEKHAR, M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.18, n.3, p.667-671, 1999.

SYNGE, B.A.; CLARK, A.M.; MOAR, J.A.E.; NICOLSON, J.T.; NETTLETON, P.F.; HERRING, J.A. The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.223-229, 1999.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, virological and immunological observations. *Veterinary Quarterly*, v.19, p.97-101, 1997.

THIBAUT, J.C.; CREVAT, D.; CHAPPUIS, G. Control of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle: examples of the combined use of serological screening, viral antigen detection and vaccination. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. v.12, n.2, p.471-481, 1993.

THÜR, B.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in skin biopses: a reliable and fast diagnostic tool. *Journal of Veterinary Medicine*, v.43, p.163-166, 1996.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Medicine*, v.91, n.9, p.858-866, 1996.

VAN OIRSCHOT, J.T. The BVDV situation in Europe. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. *Anais...* p. 33-37.

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

WOODARD, B.F. BVD virus associated with outbreaks of abortion, stillbirths, and weak calves. *Veterinary Medicine*, v.89, n.4, p.379-384, 1994.

ZUIDHOF, S.; MASON, S. *Protect your herd from BVD*. Disponível em: <<http://www.afns.ualberta.ca/deag/deag3b1.htm>>. Acesso em: 6 nov. 2000.

## 9 ABSTRACT

**“Detection of antibodies to the bovine viral diarrhoea virus (BVD) in serum, in individual milk and in bulk tank milk from unvaccinated herds”**

The correlation between the proportion of reactor lactating cows and the presence of antibodies to the bovine viral diarrhoea virus (BVD) in bulk tank milk was studied by using the ELISA test. Serum and individual milk samples from 376 unvaccinated lactating cows from 10 herds located in the south region of the State of Minas Gerais and the northeast region of the State of São Paulo as well as one milk sample from the bulk tank milk of each herd were analysed. Reacting serum samples were found in all the herds, and this occurrence varied from 12.28 to 100.00%. The analysis of individual milk samples did not show reacting cows in two herds, while the other herds had an occurrence varying from 5.26 to 70.83%. Antibodies were detected in bulk tank milk from herds whose proportion of reacting sera was equal to or higher than 82.86%, and whose proportion of reacting individual milk samples was equal to or higher than 32.14%.