

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PREVALÊNCIA DOS PRINCIPAIS VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM
BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA, NO ESTADO DO PARANÁ

DANIELLA SPONCHIADO

Botucatu-SP
Dezembro 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PREVALÊNCIA DOS PRINCIPAIS VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM
BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA, NO ESTADO DO PARANÁ

DANIELLA SPONCHIADO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para obtenção
do título de Doutora.

Orientador: Prof. Adj. Roberto Calderon Gonçalves
Co-orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU -
UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sponchiado, Daniella.

Prevalência dos principais vírus respiratórios em
bovinos da raça holandesa, no Estado do Paraná /
Daniella Sponchiado. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Co-orientador: Ivan Roque De Barros Filho

Capes:50502050

1. Bovino - Criação. 2. Bovino de leite. 3. Estudos
transversais. 4. Viroses em animais. 5. Vírus do herpes
em animais.

Palavras-chave: Paraná; Prevalência;
Virusneutralização; bovinocultura de leite; vírus
respiratórios.

Daniella Sponchiado

**PREVALÊNCIA DOS PRINCIPAIS VIRUS RESPIRATÓRIOS EM BOVINOS
DA RAÇA HOLANDESA, NO ESTADO DO PARANÁ**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Roberto Calderon Gonçalves

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Simone Biagio Chiacchio

Membro

Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. José Paes Oliveira Filho

Membro

Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Dr^a Silvia Cristina Osaki

Membro

Departamento de Medicina Veterinária - UFPR-Setor Palotina – Palotina

Prof^a Dr^a Andreza Amaral da Silva

Membro

Departamento de Medicina e Cirurgia - UFRRJ- Seropédica

Data da Defesa: 16 de dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Lindamir e Delvino**, pelo amor e apoio durante essa etapa de minha vida e por muitas vezes abdicarem de seus objetivos para sonhar junto comigo.*

“Família não é uma coisa importante, é tudo”.

(Michael J. Fox)

*Ao meu orientador **Roberto Calderon Gonçalves**, por toda paciência e dedicação prestada para realização desse trabalho e pelos ensinamentos durante essa fase de minha vida.*

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proteger e estar presente em minha vida, guiando meu caminho.

Aos meus pais, Lindamir e Delvino, por me dar toda sustentação necessária para seguir em frente com meus sonhos.

Ao meu amor, Marçal Heron da Silva, pois muitas vezes abdicou de seu crescimento profissional para estar ao meu lado, por sempre sonhar junto comigo em formar uma família. Conseguimos! Agora somos eu, você e nosso Luca.

Ao meu orientador, Roberto Calderon Gonçalves, pelos conhecimentos divididos, paciência, dedicação e carinho a mim destinado. Muito obrigada, por ter acreditado que tudo iria dar certo, o senhor sempre será um grande Mestre.

Ao meu co-orientador, Ivan Roque de Barros Filho, por me mostrar a arte de ser buiatra, de clinicar, pela grande amizade e por apoiar meus sonhos mesmo estando longe.

À Chefe do Laboratório de Vírus de Bovinos do Instituto Biológico de São Paulo (LVB-IB), Edviges Maristela Pituco, por disponibilizar o local para realização das análises assim como os materiais necessários. Por todo conhecimento e ensinamentos passados. E a toda equipe do LVB-IB, em especial a Maira de Souza Nunes Martins e Vivian da Silva Cardoso pela realização das análises para conclusão do projeto. Saibam que vocês me ajudaram a realizar um grande sonho, contem sempre comigo.

À Andreza Amaral da Silva, por ter me apresentado o meu orientador, Roberto Calderon Gonçalves, pelo apoio durante esta caminhada, pelas palavras de conforto, por acreditar na minha capacidade e por simplesmente por ter ouvidos para me escutar, por nossa amizade. Você é um grande exemplo de guerreira.

À Julia Arantes Galvão, obrigada por dividir seu lar durante minha breve estadia em Botucatu, pela generosidade, pela paciência, você é uma irmã para mim.

Às colegas e amigas de pós-graduação, Bianca Paola Santarosa, Gabriela Nascimento Dantas, Mayra Teixeira Alas Martins por deixarem seus afazeres de lado para me ajudar. Muito obrigada meninas, quando vocês precisarem estarei à disposição.

À Marlene Voltani, meu braço direito e esquerdo, a qual sempre me apoiou nesse sonho, me acompanhou durante três anos esse projeto e nunca me desanimou. Obrigada pelo carinho, pelo café quentinho toda manhã, pelas risadas e lágrimas enxugadas e pelas palavras de conforto no momento do desespero. Você é um exemplo de vida.

À Prof. Ana Tereza Bittencourt Guimarães e o Prof. Adriano Dias pela contribuição na realização dos cálculos estatísticos.

A todos os professores da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, em especial, aos da Clínica de Grandes Animais, por todo conhecimento passado e momentos descontração.

A todos os servidores da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, obrigada pelos serviços prestados, sempre que solicitado.

A todos os profissionais e proprietários que disponibilizaram suas propriedades e seus animais para realização das coletas de materiais para realização do experimento desse projeto.

Aos animais, em especial, os bovinos utilizados no experimento, pois sem eles nada seria possível.

À Agência de Defesa Agropecuária do Paraná, por ter liberado meu ponto para realização desse sonho. Em especial aos colegas de trabalho da Unidade Regional de Ponta Grossa e Umuarama que me substituíram na Unidade de Sanidade Agropecuária de Tibagi e Iporã.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta história.

Pouco importa o julgamento dos outros. Os seres são tão contraditórios que é impossível atender as suas demandas e satisfazê-los. Tenha em mente: ser autêntico e verdadeiro.

(Dalai Lama)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Pesquisas nacionais avaliando a prevalência de animais soropositivos para o Vírus da Diarreia Viral Bovina.....	15
TABELA 2	Comparação entre os tipos de testes diagnósticos para detecção da infecção por Vírus da Diarreia Viral Bovina quanto à sensibilidade, tempo para obtenção do resultado e custo.....	17
TABELA 3	Pesquisas nacionais avaliando a prevalência de animais soropositivos para o Herpesvírus Bovino 1.....	23
TABELA 4	Distribuição da coleta das amostras por região amostral e por município coletado.....	36
TABELA 5	Resultado da virusneutralização para os vírus respiratórios Herpesvírus Bovino 1, Vírus da Diarreia Viral Bovina, Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3, Vírus Respiratório Sincicial Bovino em bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca, não vacinados e criados no Estado do Paraná, utilizando o método de diagnóstico de virusneutralização.....	45
TABELA 6	Distribuição dos casos isolados e de coinfeção entre os quatro vírus respiratórios nas amostras de soro analisadas de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca, não vacinados criados no Paraná, utilizando o método de diagnóstico de virusneutralização.....	47
TABELA 7	Resultado de soropositividade dos vírus respiratórios estudados em propriedades leiteiras da raça Holandesa variedade Preta e Branca, criados no estado do Paraná, utilizando o método de diagnóstico de virusneutralização.....	48
TABELA 8	Prevalência de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca sororreagentes aos quatro vírus respiratórios estudados conforme as regiões do estado do Paraná estudadas.....	49

TABELA 9	Prevalência de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca soropositivos para Herpesvírus Bovino 1, conforme a faixa etária estudada.....	50
TABELA 10	Prevalência de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca soropositivos para Herpesvírus Bovino 1 conforme os tipo de manejos: monta natural, reutilização luva de palpação e compartilhamento de pasto com vizinhos.....	51
TABELA 11	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Herpesvírus Bovino 1 conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.....	52
TABELA 12	Coeficientes (valor) e Odds ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o Herpesvírus Bovino 1.....	54
TABELA 13	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Diarreia Viral Bovina conforme os sistemas de produção.....	56
TABELA 14	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Diarreia Bovina conforme a faixa etária dos bovinos estudados.....	56
TABELA 15	Prevalência de bovinos reagentes ao Vírus da Diarreia Viral Bovina conforme o manejo.....	57
TABELA 16	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Diarreia Viral Bovina conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.....	58
TABELA 17	Coeficientes (valor) e Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o BVDV.....	60
TABELA 18	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 conforme a faixa etária dos animais.....	62
TABELA 19	Prevalências de bovinos sororreagentes ao Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 conforme o manejo de compartilhamento de pasto com vizinhos.....	62

TABELA 20	Prevalência de bovinos sororreagentes ao Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.....	64
TABELA 21	Coeficientes (valor) e Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3.....	65
TABELA 22	Prevalência de bovinos sororreagentes ao Vírus Respiratório Sincicial Bovino conforme os sistemas de produção.....	67
TABELA 23	Prevalência de bovinos sororreagentes ao Vírus Respiratório Sincicial Bovino conforme a área da propriedade em hectares.	67
TABELA 24	Coeficientes (valor) e Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o BRSV.....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Distribuição da Diarreia Viral Bovina no mundo de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde Animal, referente ao ano de 2013.....	12
FIGURA 2	Distribuição da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) no mundo de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde Animal, referentes ao ano de 2013.....	20
FIGURA 3	Localização geográfica dos municípios participantes da pesquisa dentro do Estado do Paraná	35
FIGURA 4	Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Herpesvírus Bovino 1.....	55
FIGURA 5	Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Vírus da Diarreia Viral Bovina.....	61
FIGURA 6	Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3.....	66
FIGURA 7	Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Vírus Respiratório Sincicial Bovino.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
Ac-ELISA	Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpo
Ag-ELISA	Ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno
BoHV- 1	Herpesvírus Bovino 1
bPIV-3	Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo-3
BRSV	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
BVDV	Vírus da Diarreia Bovina
CFR	Code of Federal Regulation
CP	Citopatogênico
CRSV	Vírus Respiratório Sincicial Caprino
DM	Doença das Mucosas
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GTA	Guia de Transito Animal
HI	Inibição de Hemoaglutinação
HN	Hemaglutinina-Neuraminidase
HPB	Holandês Preto e Branco
HRSV	Vírus Respiratório Sincicial Humano
IHC	Imunohistoquímica
IPV/IBV	Vulvovaginites e Balanopostite pustular
LVB-IB	Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDBK	Madin & Darby Bovine Kidney
MEM	Meio Essencial Mínimo
NCP	Não Citopatogênico
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OR	Odds Ratio
ORSV	Vírus Respiratório Sincicial Ovino
PI	Persistentemente Infectados

PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
ROC	Receiver Operator Characteristic Curve
RT- PCR	Transcrição Reversa combinada à Reação em Cadeia pela Polimerase
SFB	Soro Fetal Bovino
TPP	Techno Plastic Products
VN	Virusneutralização

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	05
2	REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1	VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA	08
2.2	HERPESVÍRUS BOVINO 1	18
2.3	VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3	24
2.4	VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO	28
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DO ESTUDO	33
4.3	CÁLCULO AMOSTRAL	33
4.4	ANIMAIS	34
4.5	DESENHO DO ESTUDO	36
4.6	CRITÉRIO DE INCLUSÃO AMOSTRAL	37
4.7	COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	37
4.8	FATORES DE RISCO	37
4.9	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	38
4.9.1	Manutenção das culturas celulares	38
4.9.2	Estirpes Virais	39
4.9.3	Multiplicação dos vírus padrões	39
4.9.4	Titulação viral	40
4.9.5	Pesquisa de anticorpos neutralizantes – Teste de Vírusneutralização	41
4.9.6	Validação da reação	43
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS	45
5.1	PREVALÊNCIAS DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ENCONTRADOS EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA VARIEDADE PRETA E BRANCA CRIADOS NO ESTADO DO PARANÁ	45

5.2	PREVALÊNCIA DOS CASOS ISOLADOS E DE COINFECÇÃO ENTRE OS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ESTUDADOS.....	45
5.3	PREVALÊNCIA DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS CONFORME AS PROPRIEDADES ESTUDADAS.....	47
5.4	PREVALÊNCIA DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ESTUDADOS NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DE LEITE DO ESTADO (SUDOESTE, OESTE, CENTRO ORIENTAL) E DEMAIS REGIÕES E A ASSOCIAÇÃO DE BOVINOS SORORREAGENTES AOS QUATRO VÍRUS PESQUISADOS.....	48
5.5	HERPESVÍRUS BOVINO 1.....	49
5.5.1	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BoHV-1 conforme a faixa etária dos animais.....	49
5.5.2	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BoHV-1 conforme o manejo.....	50
5.5.3	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BoHV-1 conforme às características das propriedades e a movimentação de animais.....	51
5.5.4	Modelo de regressão logística para o BoHV-1.....	53
5.6	VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA.....	55
5.6.1	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme os sistemas de produção.....	55
5.6.2	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme a idade dos bovinos estudados.....	56
5.6.3	Prevalência de bovinos reagentes ao BVDV conforme o manejo.....	56
5.6.4	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.....	57
5.6.5	Modelo de regressão logística para o BVDV.....	58
5.7	VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3.....	61

5.7.1.	Prevalência dos bovinos sororreagentes ao bPIV-3 conforme a idade dos animais.....	61
5.7.2	Prevalência s de bovinos sororreagentes ao bPIV-3 conforme o manejo das propriedades.....	62
5.7.3	Prevalência de bovinos sororreagentes ao bPIV-3 conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.....	63
5.7.4	Modelo de regressão logística para o bPIV-3.....	64
5.8	VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO.....	66
5.8.1	Prevalência de bovinos sororreagentes ao BRSV conforme os sistemas de produção.....	66
5.8.2	Prevalência de bovinos sororreagentes ao BRSV conforme a característica da propriedade.....	67
5.8.3	Modelo de regressão logística para o BRSV.....	67
6	DISCUSSÃO.....	70
6.1	PREVALÊNCIA DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ESTUDADOS.....	70
6.2	PREVALÊNCIA DE CASOS ISOLADOS E DE COINFECÇÕES DOS AGENTES VIRAIS ESTUDADOS.....	73
6.3	PREVALÊNCIA DOS VIRUS ESTUDADOS NAS PROPRIEDADES.....	74
6.4	PREVALÊNCIA DOS VÍRUS ESTUDADOS NAS REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ.....	76
6.5	HERPESVÍRUS BOVINO 1.....	77
6.6	VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA.....	80
6.7	VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3.....	86
6.8	VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO.....	89
6.9	CURVA DE ROC.....	91
7	CONCLUSÃO.....	92
8	REFERENCIAS.....	94
9	ARTIGO CIENTÍFICO.....	121
	ANEXOS.....	142

SPONCHIADO, D. **Prevalência dos principais vírus respiratórios em bovinos da raça holandesa, no estado do Paraná.** 2014. 151p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.

RESUMO

Realizou-se levantamento sorológico dos seguintes vírus respiratórios Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 (bPIV-3) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) em bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca (HPB), criados no estado do Paraná. Colheram-se 714 amostras de sangue da veia jugular de bovinos, não vacinados para os agentes estudados, com mais de seis meses de idade, de 26 propriedades leiteiras, distribuídas em 17 municípios do estado do Paraná. Paralelamente à colheita, aplicou-se um questionário para cada propriedade estudada, com a finalidade de avaliar os fatores de risco associados aos vírus examinados. As amostras sorológicas foram submetidas ao teste de diagnóstico de virusneutralização no Laboratório de Viroses de Bovinos do Instituto Biológico de São Paulo. Foram observadas prevalências de 22,3%; 35,8%; 80,4% e 93,5% de bovinos sororreagentes e 65,3%, 88,5%, 96,1% e 100% das propriedades reagentes para BoHV-1, BVDV, bPIV-3 e BRSV, respectivamente. A coinfeção que ocorreu com maior prevalência foi a bPIV-3 e BRSV (37,1%). Após análise de regressão logística, os fatores de risco associados ao BoHV-1 foram: bovinos com idade maior que 48 meses (OR=15,012; IC95% 7,500 – 30,051), área da propriedade 26 a 50 hectares (OR=11,328; IC95% 2,482 – 51,697), lotação maior de três bovinos por hectare (OR=1,026; IC95% 0,370 – 2,847), percentual de entrada maior que 10% de bovinos (OR=52,520; IC95% 13,269 – 207,876); para o BVDV foram: bovinos com idade maior que 48 meses (OR=4,407; IC95% 2,456 – 7,906), região Sudoeste (OR=52,388; IC95% 4,629 – 5892,873), sistema de produção semi-intensivo (OR=1,333; IC95% 0,261 – 6,815), propriedade com número de animais menor ou igual a 50 bovinos (OR=16,682; IC95% 3,218 – 86,481), percentual de entrada maior que 10% de bovinos (OR=17,56; IC95% 7,613 – 40,506) e compartilhamento de pasto com os vizinhos (OR=9,148;

IC95% 3,751 – 22,310); para bPIV-3: bovinos com idade maior que 48 meses (OR=5,530; IC95% 3,172 – 9,639), área da propriedade menor ou igual a 25 hectares (OR=1,419; IC95% 0,517 – 3,893), lotação de três bovinos por hectare (OR=8,874; IC95% 2,858– 27,554); para BRSV a região Oeste (OR=2,676; IC95% 0,344 – 20,801). Todos os vírus estudados estão disseminados nos bovinos leiteiros da raça HPB do estado do Paraná. As medidas de controle sanitário devem ser tomadas para minimizar a disseminação viral entre os rebanhos, evitando assim perdas econômicas para bovinocultura leiteira do estado.

Palavras-chave: bovinocultura de leite; vírus respiratórios; prevalência; virusneutralização.

SPONCHIADO, D. **Prevalence of major respiratory viruses in cattle Holstein, in Paraná state.** 2014. 151p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.

ABSTRACT

A serological survey of the following respiratory viruses: Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (bPIV-3) and Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) in Holstein cattle black and White (HPB), raised in Paraná state was performed. 714 blood samples were collected from the jugular vein of cattle not vaccinated for the studied agents, over six months of age, from 26 dairy herds, distributed in 17 municipalities of Paraná state. Alongside the collection, a questionnaire was used for each property studied in order to assess the risk factors associated with the viruses examined. The serum samples were subjected to the diagnosis test of virus neutralization at the Laboratory of Viral Diseases of Cattle of the Biological Institute of São Paulo. Frequencies of 22.3%; 35.8%; 80.4% and 93.5% of seropositive cattle were observed and 65.3%, 88.5%, 96.1% and 100% of the seropositive properties BoHV-1, BVDV, bPIV-3 and BRSV, respectively. The co-infection that occurred most frequently was the bPIV-3 and BRSV (37.1%). After logistic regression analysis, risk factors associated with BoHV-1 were cattle with more than 48 months of age (OR = 15.012; 95% CI 7.500 to 30.051), property area 26-50 hectares (OR = 11.328; 95% CI 2.482 – 51.697), stocking higher than three animals per hectare (OR = 1.026; 95% CI 0.370 to 2.847), cattle entry percentage higher than 10% (OR = 52.520 entry; 95% CI 13.269 to 207.876); for BVDV were cattle older than 48 months (OR = 4.407; 95% CI 2.456 to 7.906), Southwest region (OR = 52.388; 95% CI 4.629 to 5892.873), semi-intensive production system (OR = 1.333; 95% CI 0.261 to 6.815), property with fewer animals than or equal to 50 (OR = 16.682; 95% CI 3.218 to 86.481), a percentage of cattle entry higher than 10% (OR = 17.56; 95% CI 7.613 – 40.506) and neighboring pasture sharing (OR = 9.148; 95% CI 3.751 to 22.310); for bPIV-3 cattle older than 48 months (OR = 5.530; 95% CI 3.172 to 9.639), property area less than or equal to 25 hectares (OR = 1.419; 95% CI 0.517 to 3.893), stocking of three animals per hectare (OR = 8.874;

95% CI 2.858- 27.554); BRSV for the west region (OR = 2.676; 95% CI 0.344 to 20.801). All viruses studied are widespread in dairy cattle of HPB breed in Parana state. Sanitary control measures should be taken to minimize viral spread among herds, thus avoiding economic losses for dairy cattle in the state.

Keywords: dairy cattle; respiratory system; seroprevalence; virusneutralization.

1 INTRODUÇÃO

O Paraná se destaca no cenário nacional pela produção de 3.597.775.000 litros/ano de leite, o que corresponde a 11,7 % da produção brasileira, e é o terceiro estado com maior produção no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010). Tem como característica a heterogeneidade de produtores e propriedades, sendo que 51% dos animais dos rebanhos possuem características da raça Holandesa (INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2008).

Dentre os problemas enfrentados pelos produtores leiteiros no mundo destacam-se as enfermidades respiratórias, responsáveis por perdas econômicas relacionadas à diminuição da produção, retardo do crescimento, diminuição da conversão alimentar e morte dos animais acometidos (NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE, 2006).

As doenças respiratórias causam alta taxa de morbidade entre os bovinos (FARSHID et al., 2002; SNOWDER et al., 2006). A frequente exposição do sistema respiratório às variações climáticas, agentes irritativos e microrganismos patogênicos somados às particularidades do trato respiratório dos bovinos predispõem esta espécie às doenças inflamatórias pulmonares (MOSIER, 1997; RADOSTITS et al., 2007). Dentre as principais doenças infecciosas, que acometem o sistema respiratório, as pneumonias estão entre as principais causas de morte em bovinos de até um ano de idade (ASSIS-BRASIL et al., 2013).

Os problemas respiratórios classificam-se em doenças do trato respiratório anterior e posterior. Como agentes etiológicos determinantes destas doenças observam-se basicamente agentes virais, bacterianos e parasitários. As afecções de maior predominância, com maiores perdas econômicas são as do trato aéreo posterior. De maneira geral, os vírus atuam inicialmente causando pneumonias intersticiais, as bactérias provocam broncopneumonias e os parasitas a pneumonia verminótica (RADOSTITS et al., 2007).

Os agentes virais são de importância crucial nas doenças respiratórias dos bovinos. Na maioria das vezes, os vírus iniciam a infecção rompendo

barreiras, atuam na imunossupressão do indivíduo acometido, facilitando assim, a entrada de agentes oportunistas como as bactérias (MARTIN; BOHAC, 1986). Dentre os principais vírus respiratórios pode-se citar: Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Herpes Vírus Bovino 1 (BoHV-1), Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 (bPIV-3), e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) (VALARCHER; HÄGGLUND, 2006).

De maneira geral o rebanho leiteiro apresenta maior frequência de doenças respiratórias que o rebanho de corte, uma vez que a forma de manejo pode facilitar a transmissão dos agentes infecciosos (HOUE, 1999). Sistemas de produção mais intensivos adotados em propriedades com alta tecnologia, com maior lotação por metro quadrado, falta de ventilação e outros agentes predisponentes, permitem maior exposição aos agentes determinantes às afecções respiratórias. O aumento na concentração de ureia no ambiente pode lesionar o epitélio respiratório, facilitando a entrada de vírus e/ou bactéria, por exemplo (REBHUN, 2000).

Com os esforços da Defesa Sanitária do Estado do Paraná no controle e erradicação da Febre Aftosa para alcançar o status de “Área Livre sem Vacinação” e exigências sanitárias internacionais crescentes, ressalta-se a importância do controle das afecções como Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa. Para tanto, este controle deve ser realizado com base em informações epidemiológicas regionais e fatores de riscos locais.

Dentre os fatores de risco associados às doenças virais respiratórias citam-se: tamanho do rebanho, introdução de animais sem prévio exame, idade dos animais, tipo de manejo, densidade populacional, associações com outros vírus, altitude, assistência técnica e compra de touros (DIAS et al., 2008; CARBONERO et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; CHAVES et al., 2012)

Com isso, pode-se dizer que o conhecimento da prevalência dos principais agentes virais e fatores de riscos que influenciam na sua disseminação são as chaves necessárias para prevenção e controle de grande parte dos problemas respiratórios em bovinos.

Levando-se em conta o destaque do estado do Paraná na produção leiteira brasileira, a importância das doenças respiratórias dentro da produção

de bovinos leiteiros e as poucas referências nacionais e estaduais que correlacionem os principais vírus respiratórios BVDV, BoHV-1, bPIV-3 e BRSV aos possíveis fatores de riscos para disseminação, é de suma importância a realização de estudos envolvendo avaliações sorológicas dos rebanhos de bovinos para verificar a prevalência dos vírus associados a problemas respiratórios em bovinos leiteiros, assim como identificar seus fatores de risco. A partir disto, é possível estabelecer um plano de controle eficiente e prevenir, a infecção por estes agentes diminuindo as perdas econômicas e visando a permanência da abertura do mercado externo ao estado do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

O vírus da Diarreia Viral Bovina se manifesta de várias formas clínicas: subclínica, infecções respiratórias, gastroenterite, alterações cutâneas, trombocitopenia e hemorragias, problemas reprodutivos (retorno de cio, nascimento de bezerros fracos, malformações congênitas e natimortos) e, a forma altamente fatal que ocorre principalmente em animais persistentemente infectados (PI), que é a afecção denominada Doença das Mucosas (DM) (RAMSEY; CHIVERS, 1956; BAKER, 1995; FLORES et al., 2005).

O Vírus da Diarreia Viral Bovina (*Bovine viral diarrhoea virus - BVDV*) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (INTERNATIONAL COMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2012). Além dele, dentro do gênero *Pestivirus*, existem dois vírus importantes para Medicina Veterinária: o vírus da Peste Suína Clássica e o vírus ovino da doença da fronteira (*border disease*). Ambos os vírus causam doenças de notificação obrigatória à Organização Mundial da Saúde Animal e podem ser empecilho para exportação de produtos cárneos e derivados, assim como de material genético (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2013).

Os *Pestivirus* são vírus esféricos com 40 a 60nm de diâmetro, envelopados, com capsídeo icosaédrico tendo genoma RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade positiva, de aproximadamente 12,5kb (FLORES, 2007). Segundo Donis (1995), o vírus possui proteínas não estruturais (N^{pro}, P₇, NS_{2/3}, NS_{4A}, NS_{4B}, NS_{5A}, e NS_{5B}), que são responsáveis pela replicação viral e, as proteínas estruturais (C, E^{ns}, E₁, E₂), as quais fazem um papel importante no revestimento do material genético do vírus e possibilitam a entrada e a saída de partículas virais das células infectadas.

De acordo com o efeito causado no cultivo celular o BVDV pode ser dividido em dois biótipos: citopatogênico (CP) e não citopatogênico (NCP). Os vírus CP são encontrados principalmente em amostras de animais afetados pela Doença das Mucosas (DM) e os NCP na maioria dos isolados a campo

(FLORES, 2003; RIDPAHT, 2005). A primeira classificação está relacionada com o efeito de vacuolização citoplasmática e destruição celular acentuada em 48 a 72 horas, culminando com extenso dano no cultivo celular. O não citopático caracteriza-se por ausência de dano celular ou pouca mudança nas células de cultivo (FLORES, 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Dentre os mais de cinquenta BVDV listados por Flores et al. (2005), caracterizados no Brasil no período de 1974 a 2004, a maioria pertenceu ao biótipo NCP. As amostras virais de campo foram originárias dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Paraná, Minas Gerais e Rondônia.

Outra característica marcante do vírus da diarreia viral bovina é a variabilidade antigênica, essa particularidade proporcionou a divisão do BVDV em dois grupos antigênicos BVDV-1 e BVDV-2, ambos já isolados no Brasil, a partir de diferentes materiais biológicos (soro sanguíneo e feto abortado) e históricos clínicos (sinais respiratórios persistentes e doença gastroentérica) (FLORES et al., 2005).

Duas amostras citopáticas de BVDV (BVDV-1: IBSP-2 e BVDV-2: SV-253) foram caracterizadas e submetidas à atenuação para testar a eficiência para formulação de vacinas atenuadas. O estudo comprovou a eficiência das amostras brasileiras, uma vez que a inoculação induziu titulação moderada a elevada de anticorpos neutralizantes frente às amostras homólogas e isolados brasileiros. Isso evidencia a importância da introdução dessas amostras às vacinas atenuadas produzidas contra o BVDV e utilizadas no Brasil (LIMA et al., 2004).

O BVDV-1 é subdividido em dois subgrupos. O primeiro responsável por infecção respiratória é o BVDV-1.a e, o BVDV-1.b, é mais comum nas infecções fetais e gestacionais tardias. O segundo grupo antigênico (BVDV-2) também possui pelo menos duas subdivisões diferentes (BVDV-2.a e BVDV-2.b) conforme diferenças genômicas e antigênicas, que relacionam-se com surtos agudos de diarreias, doenças respiratórias graves e doenças hemorrágicas. Os biótipos citopagênicos e não citopagênicos podem ocorrer em ambos os grupos antigênicos (BVDV-1 e BVDV-2) (FLORES, 2007).

Ao realizar o sequenciamento e análise filogenética em 17 amostras de BVDV isoladas no Brasil, Flores et al. (2000) identificaram 23,5% das amostras pertencentes ao genótipo 1 (BVDV-1a), 52,9% das amostras pertencentes à BVDV-1b e 23,5% pertencentes ao genótipo BVDV-2. Porém, as amostras identificadas como BVDV-2, diferenciam-se genotipicamente das amostras identificadas na América do Norte e Europa, o que evidencia a variabilidade genética do BVDV.

A transmissão do vírus ocorre de forma direta (focinho-focinho, coito e secreções mucosas), assim como de forma indireta (focinho-secreção e/ou excreções, focinho-feto abortado/placenta). A ocorrência da transmissão por agulhas, materiais cirúrgicos, luva de palpação e sêmen contaminado também é possível. A transmissão transplacentária pode originar animais PI, que são a chave para o controle da doença (FLORES, 2003).

É importante salientar que a principal fonte de infecção são os animais PI, que são oriundos de fêmeas infectadas, durante os 40 e 120 dias de gestação, quando o sistema imune do feto ainda está reconhecendo seus próprios antígenos. Pela falha do sistema imune, a progênie reconhece a proteína viral como sendo própria, não atuando sobre ela para sua eliminação. Isso faz com que o PI seja portador e elimine o vírus continuamente durante sua vida (FLORES et al., 2005). Brito et al. (2010), desenvolveram um estudo de soroprevalência de BVDV no estado de Goiás e encontrou 0,42% de animais PI. As amostras foram provenientes de propriedades distribuídas por todo o estado. Já Botton et al. (1998), observaram 0,75% de animais PI nas análises de amostras de soro fetal vindos de animais de abatedouros do estado do Rio Grande do Sul.

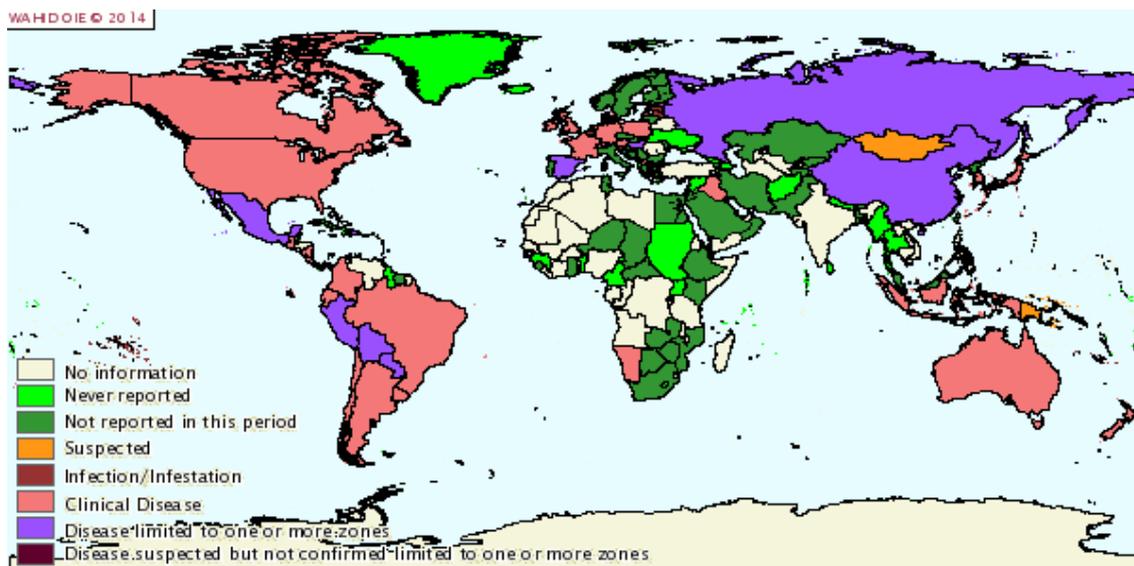
No estudo realizado por Pacheco (2010) para avaliação dos riscos de entrada da doença em rebanhos, concluiu-se que a compra de animais sem prévio exame ou sem comprovação de vacinação, é uma das formas de introdução viral em uma propriedade controlada. Esta conclusão complementa àquela obtida por Flores (2007), que observou que a introdução de animais PI, touros PI, ou fêmeas gestando fetos PI é, na maioria das vezes, a forma de transformar uma exploração pecuária sadia em infectada. Dentre outros fatores de riscos pode-se citar a idade, tamanho do rebanho, tamanho da propriedade

e a realização de quarentenas ao introduzir animais na propriedade (MAINAR-JAIME et al., 2001; SARRAZIN et al., 2013)

No Brasil, a realização de um estudo utilizando animais PI proveniente de fêmeas infectadas com biótipo NCP, para avaliar a excreção e transmissão viral, demonstrou que os bezerros apresentaram viremia persistente com títulos medianos a altos e, as secreções nasais e oculares apresentaram grande quantidade de vírus excretado. Além disso, a transmissão viral em rebanho de manejo semiextensivo foi mais rápida, comparada com o manejo extensivo, o que comprova a importância do animal PI para disseminação do BVDV (ARENHART et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) adicionou a BVDV à lista de doenças de notificação obrigatória no ano de 2001, devido à propagação internacional, e à importância para o comércio de animais. É, assim, um forte sinal que o BVDV está tornando-se uma prioridade internacional (LINDBERG et al., 2006). Segundo Flores et al. (2005), em países e regiões onde a Febre Aftosa foi erradicada, o BVDV desperta interesse crescente em criadores, autoridades sanitárias, pesquisadores e principalmente em laboratórios produtores de vacina.

A OIE classifica a ocorrência de doenças de notificação obrigatória de acordo com as informações repassadas pelos países. As informações podem se enquadrar nas seguintes classes: sem informação, nunca relatada, não observada nesse período, suspeita, infecção/infestação, doença clínica, doença limitada a uma ou mais zonas, suspeita da doença sem confirmação limitada a uma ou mais zonas. Na Figura 1 está ilustrada a distribuição da BVDV no mundo, segundo informações da OIE, referentes ao ano de 2013.



Fonte: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap Acesso em 13/10/2014.

FIGURA 1 - Distribuição da Diarreia Viral Bovina no mundo de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde Animal, referente ao ano de 2013.

A distribuição do vírus é cosmopolita independente da raça, idade, sexo, finalidade da exploração (leite/corte). O agente está presente na maioria dos países que se destacam na produção de bovinos e causa grandes perdas econômicas (FLORES, 2007).

O BVDV não tem o bovino como seu único hospedeiro, podendo acometer búfalos (SUDHARSHANA et al., 1999), ovinos (GONÇALVES et al., 2011), caprinos (CASTRO et al., 1994) e javalis (FLORES et al., 2005).

A prevalência média mundial é de 60% em animais adultos e a percentagem de animais PI é de 1 a 2% do rebanho global de bovinos (HOUE, 2003).

Existem inúmeros levantamentos sorológicos do vírus pelo mundo. Em 1999, Sudharshana e colaboradores desenvolveram levantamento sorológico na Índia, em bovinos e bubalinos, totalizando 439 amostras colhidas de 17 diferentes estados do país, sendo que 15,29% (50/327) amostras bovinas e 23,21% (26/112) das amostras bubalinas reagiram ao Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

Na Espanha realizou-se levantamento sorológico utilizando o método diagnóstico de ELISA. Foram investigadas 529 amostras de soro sanguíneo de

animais não vacinados de 28 rebanhos, e 21% das amostras testadas foram soropositivas (MAINAR-JAIME et al., 2001).

Com a finalidade de estimar a prevalência e fatores de risco relacionados à soropositividade do BVDV de bovinos de corte não vacinados na região de Yucatan, México, Solis-Calderon et al. (2005), colheram 560 amostras de soro bovinos originados de 40 rebanhos, e a soroprevalência foi de 14% ao teste diagnóstico de ELISA.

Em estudo realizado na Jordânia em 62 rebanhos de bovinos leiteiros não vacinados contra o BVDV, a prevalência foi de 31,6% das amostras pesquisadas pelo método de diagnóstico de ELISA e 80,7% dos rebanhos apresentavam-se infectados pelo vírus. Dentre os fatores de riscos associados à soropositividade pode-se citar: o tamanho do rebanho, a presença de trabalhadores de outras fazendas e a não realização de quarentena nos animais adquiridos (TALAFHA et al., 2009).

Em inquérito sorológico realizado na Bélgica, foram incluídos 770 rebanhos de bovinos, em um total de 5212 animais selecionados para o estudo e, como resultado, 47,4% dos rebanhos e 32,9% das amostras foram positivas para o teste diagnóstico de ELISA (SARRAZIN et al., 2013).

Dentre os países da América do Sul, no Chile, a prevalência de BVDV foi de 74,3% (248/334) em bovinos de rebanhos leiteiros, 74,9% (254/339) nos de corte, 72,0% (198/275) em rebanho misto e, em 100% dos rebanhos estudados, tinha pelo menos um animal positivo para o teste diagnóstico de virusneutralização (REINHARDT et al., 1990). No Uruguai, 69% de um total de 6348 soros sanguíneos de bovinos de corte foram reagentes ao teste diagnóstico de ELISA (GUARINO et al., 2008). Na Venezuela, a prevalência em bovinos de corte é de 36% (OBANDO et al., 1999). No Equador, a prevalência é de 36,2% das 2368 amostras de soros sanguíneos bovinos e 74% dos rebanhos são positivos para o BVDV para teste diagnóstico de ELISA (SAA et al., 2012). No Peru, 96% dos rebanhos leiteiros estão acometidos pelo vírus (STAHL et al., 2002).

A maioria dos estados brasileiros apresenta levantamentos sorológicos ou relatos de ocorrência das doenças causadas pelo BVDV. Independente do tipo

e número de amostra (soro, sangue total, órgãos) utilizada para determinar a prevalência do vírus no Brasil, é fato que o BVDV está presente nos rebanhos de corte e de leite em todo o nosso país (FLORES et al., 2005).

O primeiro relato da DM no Brasil foi no Estado de São Paulo, descrito por Correa et al. (1968). Após seis anos, o vírus foi isolado inicialmente em bezerros, no Rio Grande do Sul (VIGOR, 1974). Aproximadamente 35% dos bovinos e mais de 70% das propriedades já tiveram contato com o vírus (FLORES, 2003). No estado do Paraná a prevalência viral fica em torno de 50 a 73% das amostras estudadas (MÉDICI et al., 2000a, BIOGENISIS-BAGÓ, 2008). No estado de Santa Catarina as taxas são semelhantes aos descritos por Flores et al. (2003).

No sudeste brasileiro, a prevalência varia de 35,9% a 86,4% (LANGONI et al., 1995; ALEXANDRINO et al., 2011). No nordeste, a prevalência chega a 72,6% no estado de Pernambuco. Em estudos realizados no Maranhão, 65,7 a 67,5% das amostras analisadas foram positivas para BVDV (CASTRO et al., 1993; CHAVES et al., 2010; CHAVES et al., 2012). No Centro-oeste brasileiro encontraram-se variações de 34,5% a 84% na prevalência do vírus nos rebanhos de bovinos (RICHTZEINHAIN, 1997; BRITO et al., 2002).

Pituco e Del Fava (1998), após analisarem 4065 soros bovinos provenientes de animais com quadro reprodutivo, determinaram que 47,7% das amostras foram reagentes ao teste diagnóstico. Na maioria dos estudos existentes no Brasil a forma reprodutiva da doença estava envolvida (PITUCO; DEL FAVA, 1998; GUIMARÃES et al., 2000; BRITO et al., 2002; BIOGENISIS-BAGÓ, 2008; CHAVES et al., 2010). Porém é importante ressaltar que o BVDV é um dos agentes causadores de afecções respiratórias responsáveis por grandes perdas econômicas no mundo (VALARCHER; HÄGGLUND, 2006).

Na Tabela 1 estão listados trabalhos relacionados à prevalência do BVDV no Brasil. Os dados relacionados na Tabela 1 devem ser interpretados com muita cautela, levando-se em consideração o histórico de vacinação ou não dos animais, tamanho do número amostral, informações sobre a presença ou não dos sinais clínicos causados pelo vírus estudado e tipo de teste diagnóstico utilizado. Todos esses fatores influenciam no resultado final de

prevalência viral, ou seja, amostras de rebanhos com sinais clínicos, na sua maioria, darão maior prevalência do vírus caso ele seja causador dos mesmos.

TABELA 1 - Pesquisas nacionais avaliando a prevalência de animais soropositivos para o Vírus da Diarreia Viral Bovina.

REGIÃO	ESTADO	PREVALÊNCIA	TESTE DIAGNÓSTICO	REFERÊNCIA	
Sul	Rio Grande do Sul	23,4%	VN	KRAHL et al., 1997	
		45%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
		39,3 a 58,8%	VN	FLORES et al., 2005	
		57,7%	VN	FRANDOLOSO et al., 2008	
		66,3%	VN	QUINCOZES et al., 2007	
		73%	ELISA	RICHTZEINHAIN, 1997	
		45%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
	Santa Catarina	34%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
	Paraná	50%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
		61,5%	VN	FLORES et al., 2005	
Sudeste	São Paulo	67%	ELISA	RICHTZEINHAIN, 1997	
		73,5%	VN	MÉDICI et al., 2000a	
		39,5%	ELISA	LANGONI et al., 1995	
		72%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
		53,8%	VN	FLORES et al., 2005	
		52,5%	VN	OLIVEIRA et al., 2012	
		78%	ELISA	RICHTZEINHAIN, 1997	
	Minas Gerais	57,6%	ELISA	SAMARA et al., 2004	
		61,7%	VN	FIGUEIREDO et al., 1997	
		64%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
Nordeste	Rio de Janeiro	65%	ELISA	RICHTZEINHAIN, 1997	
		71,4%	ELISA	MENDES et al., 2009	
		71%	ELISA	RICHTZEINHAIN, 1997	
		Bahia	14,6%	VN	RIBEIRO et al., 1987
		56%	VN	NORONHA et al., 2003	
		56%	VN	NORONHA et al., 2001	
	Maranhão	67,5%	ELISA	CHAVES et al., 2010	
		65,7%	ELISA	CHAVES et al., 2012	
		67,3%	ELISA	SOUSA et al., 2008	
	Pernambuco	72,6%	VN	CASTRO et al., 1993	
Paraíba	22,2%	VN	THOMPSON et al., 2006		
Sergipe	58,2% a 71,8%	VN	MELO et al., 1997		
Centro-Oeste	Goiás	34,5% a 35,2%	ELISA e VN	BRITO et al., 2002	
		52,1%	VN	GUIMARÃES et al., 2001	
		63,7%	VN	FLORES et al., 2005	
		71%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
		64%	ELISA E VN	BRITO et al., 2010	
	Mato Grosso	77%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
		43,6%	VN	PELLEGRIN et al., 1997	
Mato Grosso do Sul	67%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008		
	84%	ELISA	RICHTZEINHAIN, 1997		

ELISA= Ensaio Imunoenzimático, VN= Virusneutralização

Após o ano de 2000 os trabalhos de prevalência de BVDV vêm sendo associados aos possíveis fatores de risco. Essa união possibilita melhor compreensão dos pontos críticos de controle da doença. Na Espanha a alta prevalência de BVDV está ligada aos seguintes fatores de riscos: tamanho do rebanho, idade dos animais, origem e raça dos mesmos (MAINAR-JAIME et al., 2001). Já na Bélgica a diferença significativa dos fatores de riscos foi associada aos tamanhos dos rebanhos (SARRAZIN et al., 2013).

Na América Central, em um trabalho realizado no México, com amostra de animais de bovinocultura de corte, ocorreu maior prevalência em rebanhos menor ou igual a 100 animais, originados de vacas introduzidas no rebanho, do que em rebanhos do mesmo tamanho, porém originados de vacas da própria fazenda. Estas informações demonstraram a importância da situação sanitária das propriedades de origem dos animais e a necessidade da solicitação de exame diagnóstico na compra dos animais (SOLIS-CALDERON et al., 2005).

No Brasil, trabalhos como esses são escassos. Almeida et al. (2013), avaliando amostras de tanque de leite de 300 rebanhos, mostraram que em rebanhos onde era utilizada a inseminação artificial havia 2,82 vezes mais chances dos animais serem soropositivos para BVDV. Porém os autores relataram que esse fator de risco pode estar relacionado com a transmissão viral através da palpação retal dos animais, concomitante com a inseminação, fazendo assim a disseminação de fazenda a fazenda, uma vez que os técnicos de inseminação em um único dia fazem o trabalho em diversas propriedades.

Segundo a OIE, os testes diagnósticos para identificar um animal positivo para BVDV podem ser direto, com a detecção do agente causador (isolamento viral, detecção de ácidos nucleicos, ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno e coloração de lâminas histopatológicas por imunohistoquímica) ou indireto, no qual as técnicas diagnósticas irão detectar o anticorpo (virusneutralização, ensaio imunoenzimático) (OIE, 2013). Na Tabela 2 estão relacionados os tipos de testes diagnósticos para BVDV e suas respectivas sensibilidades, tempo para obter o resultado e o custo dos exames.

TABELA 2 - Comparação entre os tipos de testes diagnósticos para detecção da infecção por Vírus da Diarreia Viral Bovina quanto à sensibilidade, tempo para obtenção do resultado e custo.

TESTE	SENSIBILIDADE	TEMPO DE DIAGNÓSTICO	CUSTO
Isolamento viral	Alta	2 a 14 dias	Alto
RT-PCR ¹	Alta	1 a 2 dias	Moderado/alto
IHC ²	Alta	2 a 4 dias	Alto
Ag-ELISA ³	Baixa	2 a 6 horas	Baixo
VN ⁴	Alta	3 a 5 dias	Moderado
Ac-ELISA ⁵	Moderada	4 a 6 horas	Baixo

¹RT-PCR, transcriptase reversa- reação de cadeia polimerase; ²IHC, imunohistoquímica;

³Ag-ELISA, ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno; ⁴VN, virusneutralização;

⁵Ac-ELISA, ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpo

Fonte: Adaptado de Dubovi (2013)

Visto a ampla disseminação viral no mundo e sabendo que a afecção é de importância para a defesa sanitária, muitos países desenvolvidos do continente europeu já iniciaram o controle e erradicação da doença em seus plantéis de bovinos leiteiros e de corte. Entre esses países estão a Escócia, Irlanda, Áustria, Suíça e Alemanha (STAHL; ALENIUS, 2012).

O controle e erradicação do BVDV dos rebanhos podem ser realizados por meio de utilização de vacina, sorologia e eliminação de animais positivos e identificação e eliminação de animais PI. Lindberg e Houe (2005) propuseram um modelo para o controle da BVDV utilizando quatro ações para o programa. Segundo os autores, três delas são necessárias e obrigatórias para o êxito da implantação e desenvolvimento do programa: biossegurança, eliminação de animais PI e monitoramento dos rebanhos. A biossegurança dos rebanhos irá prevenir a entrada de animais PI e a infecção de fêmeas gestantes para evitar produzir animais PI. A eliminação dos animais PI após sua identificação e determinação da existência de anticorpos individuais é de suma importância para saber qual a real situação do rebanho em processo de controle. O monitoramento dos rebanhos é essencial para validar a eficácia do programa que está sendo aplicado e, por fim, a vacinação que é opcional, deve ser realizada nos animais não PI e sem imunização natural. O sucesso na estratégia de controle e erradicação do BVDV passa necessariamente pela identificação e eliminação dos PI (STURZA et al., 2011).

2.2 HERPESVÍRUS BOVINO 1

O Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1) pertence a Ordem *Hepesvirales*, Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Varicellovirus*. Este gênero contém mais de 16 espécies de vírus e dentre eles está o Herpesvírus Bovino 5 que anteriormente era classificado como BoHV-1 (ICTV, 2013). Este vírus é responsável por perdas na produção leiteira, assim como diminuição de índices reprodutivos do rebanho (FRANDOLOSO et al., 2008).

O BoHV-1 é o agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), doença respiratória aguda caracterizada pelos seguintes sinais clínicos: febre, anorexia, dispneia, tosse, corrimento nasal seroso ou serossanguinolento evoluindo para purulento, hiperemia, pústulas e erosões da mucosa nasal. Há casos em que os animais apresentam conjuntivite, sialorreia e ulcerações na mucosa oral tendo curso clínico de quatro a sete dias. Outras afecções podem ser causadas pelo vírus, como: balanopostite/vulvovaginite, abortos e conjuntivites (RIET-CORREA et al., 1996).

O BoHV-1 pode ser subdividido em três subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. Esta subdivisão foi realizada mediante avaliação de restrição genômica e reatividade de anticorpos monoclonais. Assim, o BoHV-1.1 é responsável pela IBR, aborto, conjuntivite e infecções sistêmicas em fetos; o BoHV-1.2a causa vulvovaginites e balanopostite pustular (IPV/IBV) em animais infectados; o BoHV-1.2b causa doenças genitais (não associadas ao aborto) e respiratórias leves, sendo incomum no Brasil (FLORES, 2007; FRANCO; ROEHE, 2007). Contudo, o tropismo dos subtipos virais do BoHV-1 para tecidos específicos e os sinais clínicos não foram bem elucidados impossibilitando afirmar até que ponto um subtipo viral que causa sinal clínico respiratório, não possa causar aborto (SPILKI et al., 2004).

A família *Herpesviridae* possui uma característica específica que é a latência, tornando o animal infectado portador por toda vida. Ainda assim, essa condição não é determinante para excreção contínua do vírus (JONES, 2003). Após a infecção inicial do trato respiratório, o vírus permanece inativo nos neurônios sensoriais do gânglio do nervo trigêmeo e nos centros germinativos

das tonsilas palatinas (RUIZ et al., 2008). Essa característica permite que os indivíduos infectados desenvolvam a doença tempos após a infecção primária. A reativação viral ocorre, na maioria das vezes, quando o animal infectado passar por algum estresse, seja por transporte, vacinação, parição, ou tratamento com drogas imunossupressoras (corticosteroides), peculiaridade importantíssima para disseminação viral (FLORES, 2007).

Segundo estudo realizado por Van Reenen et al. (2000), após inoculação experimental de BoHV-1 em bezerros isolados socialmente e bezerros que conviviam em grupo, o primeiro grupo excretou maior carga vírus que o segundo, evidenciando ação do estresse sobre o animal com reativação da replicação viral, fato esse importante para disseminação do vírus entre o rebanho.

A transmissão viral ocorre preferencialmente pelo contado direto entre o animal infectado e o susceptível, pelas secreções respiratórias, oculares e genitais (LEMAIRE et al., 1994; FLORES, 2007). A transmissão por aerossóis é possível, em curtas distâncias entre os animais (MARS et al., 1999; MUYLKENS et al., 2007). A transmissão transplacentária foi comprovada, porém depende da imunidade da gestante. Outra forma de transmissão pelo sêmen de animais contaminados (RADOSTITS et al., 2007; ROCHA et al., 2001).

Há fatores de riscos que propiciam a infecção do BoHV-1 e, dentre eles, pode-se citar a idade dos animais, sexo, densidade do rebanho, participação de eventos, compra de touros, introdução de animais infectados, compartilhamento de pasto e falta de assistência técnica (LEMAIRE et al., 1994; BOELAERT et al., 2005; BARBOSA et al., 2005; DIAS et al., 2008; PACHECO, 2010).

Silva et al. (1995), observaram que com o aumento da idade dos animais estudados ocorreu também o aumento da taxa de infecção dos animais. Em um estudo realizado na Bélgica foi observado que o sexo dos animais era fator de risco para a infecção por BoHV-1. Este fator foi considerado novo para os autores e explicado pelo fato de que touros participavam mais de exposições e também tinham como hábito “pular a cerca”, situações estas que poderiam

et al., 1986; GUARINO; SAIZAR, 1998; MÉDICI et al., 2000b; CARBONERO et al., 2010).

O primeiro isolamento do BoHV-1 no Brasil foi realizado a partir de amostras de caso de vulvovaginite ocorrido no estado da Bahia, no final da década de 1970 (ALICE, 1978). Outros isolamentos em diversos materiais (feto, sangue, órgão) foram realizados, dentre eles, em animais com quadros respiratórios (NOGUEIRA et al., 1986; RIBEIRO et al., 1987; SUAREZ-HEILEN et al., 1993; LOBATO et al., 1995).

A distribuição do BoHV-1 no território brasileiro é muito ampla. Ao analisar, por meio do teste diagnóstico de vírusneutralização, 1.681 amostras de soro bovino provenientes de rebanhos com problemas reprodutivos, nos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, verificou-se que 22,1% das amostras foram reagentes (PITUCO, 1988). Em estudo, realizado com 22.061 amostras de soro sanguíneo de fêmeas bovinas, distribuídas em 1.992 rebanhos pertencentes a 21 estados brasileiros, foram encontrados 13.541 (64,3%) animais soropositivos em 1.886 (94,7%) rebanhos (RICHTZEINHAIN et al., 1999a). Em levantamento realizado no ano de 1999, avaliando 2.447 amostras de soro bovino, colhidas de 55 propriedades (corte/leite) de diferentes estados do sul, sudeste e centro-oeste brasileiro e, que não apresentavam histórico de vacinação contra BoHV-1, 68,7% (1.681) das amostras eram reagentes ao teste de ELISA e 100% dos rebanhos foram considerados positivos (RICHTZEINHAIN et al., 1999b).

Takiuchi et al. (2001) analisaram 26.441 amostras de soro sanguíneo bovino para BoHV-1 (ELISA e vírusneutralização), durante o período de 1995 a 2001, originárias de rebanhos não vacinados, vindas de propriedades com exploração de leite e de corte, pertencentes aos Estados de São Paulo, Paraná, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. Os autores observaram que a prevalência variou de 52,4 e 81,7% de animais soropositivos para o BoHV-1.

Em trabalho realizado no oeste do Estado do Paraná, observou-se prevalência de 64,4% de rebanhos positivos para BoHV-1. As prevalências por tipo de exploração foram: 88% para as propriedades de bovinocultura de corte,

62,4% para as propriedades de bovinocultura de leite e 61,5% para as propriedades mistas (DIAS et al., 2008).

Dias et al. (2012) no estado do Paraná, analisaram 14.803 amostras de soro sanguíneo de 2.018 rebanhos não vacinados contra BoHV-1 e observaram prevalência de 59,9% dos animais positivos e 71,3% dos rebanhos acometidos. Os fatores de risco encontrados para infecção do viral foram rebanhos de corte, compra de animais, palpação retal, registro de aborto nos últimos doze meses e monta natural.

Na microrregião de Imperatriz no estado do Maranhão, realizou-se um estudo em 48 rebanhos de bovinos de corte não vacinados, onde foram coletadas 1104 amostras de soro sanguíneo e analisados utilizando o método de diagnóstico de ELISA, e 62,23% das amostras de soro foram positivas, 34,51% negativas e 2,26% suspeitas. Consideraram-se como fatores de risco para transmissão viral: retorno de cio, reposição de animais oriundos de outros estados/regiões, criação de caprinos e ovinos associadas aos bovinos (FREITAS et al., 2014).

No estado do Espírito Santo foram examinadas 1.161 amostras de soro sanguíneo de 59 rebanhos de bovinos leiteiros não vacinados contra BoHV-1. Diagnosticaram-se que 66,75% dos soros analisados apresentaram anticorpos neutralizantes para o vírus estudado e 100% dos rebanhos foram considerados positivos (SANTOS et al., 2014).

Na Tabela 3, observa-se a prevalência do BoHV-1 no Brasil, de acordo com região, estado e referência.

TABELA 3 - Pesquisas nacionais avaliando a prevalência de animais soropositivos para o Herpesvírus Bovino 1.

REGIÃO	ESTADO	PREVALÊNCIA	TECNICA DIAGNÓSTICA	REFERÊNCIA	
Sul	Rio Grande do Sul	18,8%	VN	LOBATO et al., 1995	
		29,3%	VN	KRAHL et al., 1997	
		29,2%	VN	HÖLZ et al., 2009	
		33,0%	VN	WIZIGMANN et al., 1972	
		44,3%	VN	VIDOR et al., 1995	
		53%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
	Santa Catarina	81,7%	VN	RAVAZZOLO et al., 1989	
		46%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
		Paraná	27,1%	VN	BARRO FILHO et al., 1997
			41,9%	ELISA	TEIXEIRA et al., 2001
		46%	ELISA e VN	BIOGENISIS-BAGÓ, 2008	
		41,9 a 50,8%	VN	MÉDICI et al., 2000b	
		54,0%	ELISA	MÉDICI et al., 1996	
		59,0%	ELISA	DIAS et al., 2012	
Nordeste	Maranhão	71,3%	ELISA	BEZERRA et al., 2012	
		63,2%	ELISA	FREITAS et al., 2014	
	Paraíba	62,7%	VN	MELO et al., 1999	
	Pernambuco	69,5%	VN	SILVA et al., 1995	
	Sergipe	96,0%	VN	MELO et al., 1997	
	Bahia	10,8%	VN	RIBEIRO et al., 1987	
34,5%		VN	GALVÃO et al., 1962/1963		
52,8%		HE	ANUNCIAÇÃO et al., 1990		
Norte	Rondônia	86,2%	VN	OKUDA et al., 2006	
	São Paulo	40,2%	ELISA	TONIN et al., 1996	
		42,2%	VN	MUELLER et al., 1981	
		49,5%	ELISA	LANGONI et al., 1995	
		52,5%	VN	ALEXANDRINO et al., 2011	
Sudeste	Minas Gerais	68,3%	VN	JUNQUEIRA et al., 2006	
		58,2%	ELISA e VN	ROCHA et al., 2001	
		66,1%	SN	ALEXANDRINO et al., 2011	
	Rio de Janeiro	66,2%	HE	ANUNCIAÇÃO et al., 1989	
		81,5%	HE	ANUNCIAÇÃO et al., 1989	
	Espírito Santo	66,7%	VN	SANTOS et al., 2014	
	Centro	Goiás	51,9%	VN	BARBOSA et al., 2005
83%			ELISA	VIEIRA et al., 2003	
Oeste	Mato Grosso	85,7%	HE	ANUNCIAÇÃO et al., 1989	
		52% a 66%	SN	PELLEGRIN et al., 1997	

ELISA= Ensaio Imunoenzimático, HE=Hemoaglutinação Passiva, VN= Virusneutralização

Segundo Takiuchi et al. (2001), o histórico sanitário do rebanho em questão, assim como as taxas de produtividade e programas de vacinações podem ajudar no diagnóstico do BoHV-1, porém somente técnicas laboratoriais podem confirmar o diagnóstico viral. Dentre os métodos de diagnósticos laboratoriais para Herpesvírus Bovino 1, pode-se citar o

isolamento viral, virusneutralização, ensaio imunoenzimático, isolamento viral, reação em cadeia da polimerase, virusneutralização, ensaio imunoenzimático, imunoperoxidase e imunofluorescência.

Na inexistência de tratamento, o controle da disseminação viral é de fundamental importância para impedir o avanço da doença nos rebanhos. Vacinas comerciais podem ser usadas para prevenir o desenvolvimento dos sinais clínicos e eliminação de partículas virais, porém não impedem a infecção viral e a latência. Há basicamente duas condutas de combate à disseminação viral: a utilização de vacina (PITUCO et al., 1997) e a não utilização de vacina, realizando o descarte de animais positivos (DEL FAVA et al., 1998). Ambos os métodos foram eficazes e comprovados pelos autores acima, porém cada qual deve ser utilizado em rebanhos com características diferentes. De forma geral, rebanho onde não se tem controle de trânsito dos animais e a prevalência é de moderada a alta, a utilização do controle através do descarte dos animais é inviável, e portanto, se recomenda a utilização de vacinas (FLORES, 2007).

Segundo Del Fava et al. (2002), no Brasil ocorre falta de dados que caracterizem as propriedades (índices reprodutivos e produtivos, tipo de manejo zootécnico) e essa característica brasileira tem gerado diferentes condutas entre técnicos e criadores em relação à adoção de ações profiláticas. A inexistência de controles oficiais direcionados a esse vírus facilita a sua disseminação nos rebanhos.

2.3 VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3

O vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Respirovirus* (ICTV,2013). Este vírus está genética e antigenicamente associado com o vírus da Parainfluenza tipo 3 em humanos e o vírus Sendai de ratos (MURPHY et al., 1999).

Os bPI-3 são vírus-RNA de fita simples, de polaridade negativa, que codificam sete proteínas e, dentre elas, destaca-se a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a proteína F. Ambas estão envolvidas com a patogenia

da infecção viral, sendo a HN responsável pelas ligações aos receptores, a hemoaglutinação das hemácias e a proteína F, responsável pela penetração e transmissão do agente entre as células. Ambas as proteínas são responsáveis pelo efeito citopático no cultivo celular, caracterizado pela formação de sincício. Além dos bovinos, o vírus pode infectar cães, equinos, macacos e humanos (FLORES, 2007). Este vírus é determinante na produção de pneumonias em bezerros e ovinos, acometendo na maioria das vezes animais jovens (SARDI et al., 2002).

O bPIV-3 infecta bezerros de dois a oito meses, criados em sistemas intensivos. Na maior parte dos casos, os animais infectados pelo vírus apresentam quadros clínicos brandos, porém tornam-se graves quando associados com infecções bacterianas secundárias (KAPIL; BASARABA, 1997). Condições de alta densidade de animais e de pouca ventilação podem possibilitar a transmissão viral por aerossóis e pelo contato direto (RADOSTITS et al., 2007).

Dentre os sinais clínicos destacam-se apatia, febre, taquipneia, corrimento nasal seroso abundante e lacrimejamento. O curso da doença pode se estender aproximadamente por sete dias (sem infecções secundárias) podendo ser observados perda de escore corporal e diminuição de resistência ao exercício (GONÇALVES et al., 2003). Alguns animais podem desenvolver pneumonia intersticial inicial, na qual a consolidação da inflamação está usualmente presente apenas nos lobos anteriores dos pulmões (MURPHY et al., 1999; YATES, 1982).

A disseminação da doença é mundial, ocorrendo tanto em bovinos de corte quanto em leiteiros (ELLIS, 2010).

O isolamento viral ocorreu pela primeira vez na década de 1950 nos Estados Unidos da América, a partir da secreção nasal de um bovino com quadro clínico respiratório chamado de “shipping fever” ou “febre dos transportes” (ANDREWES et al., 1955). O agente causador foi inicialmente chamado de *myxovirus* SF-4 e foi isolado de um bezerro que havia participado de feira de exposição (REISINGER et al., 1959).

O primeiro isolamento do bPI-3 no Brasil ocorreu em São Paulo, em 25 amostras de pulmão de bovinos com lesões pneumônicas coletadas em abatedouros. Destas amostras foram isoladas quatro cepas do vírus, que eram antigenicamente semelhantes ao Vírus da Parainfluenza Humana (CANDEIAS et al., 1971). O segundo isolamento foi realizado a partir de um surto de aborto em bovinos, no Estado de Goiás (SILVA et al., 2002). Em 2003, Gonçalves e colaboradores, isolaram o vírus das secreções nasais de uma fêmea bovina com um mês de idade; o animal apresentou sinais clínicos respiratórios leves e, o isolamento confirmou a presença do vírus no Rio Grande do Sul, após sua evidência por estudos sorológicos.

Dentre as afecções respiratórias causadas por vírus no noroeste da Síria, em bovinos da raça Holandesa, o bPIV-3 foi detectado em 62,1% das amostras pesquisadas pela técnica diagnóstica de ELISA e, as principais associações virais observadas foi com BRSV (25,1%), BRSV/BoHV-1 (22,8%), BRSV/Adenovirus (15,6%) e BoHV-1 (12,6%) (GIANGASPERO et al., 1992).

Na Nigéria o vírus foi detectado em quatro estados do país tendo prevalência de 51,37% (337/656) das amostras de soro bovino analisadas pela técnica de Inibição de Hemoaglutinação (HI) (IBU et al., 2005).

Em levantamento sorológico realizado no México, 85,6% dos animais analisados pelo teste diagnóstico de ELISA apresentaram-se positivos para bPIV-3. (SOLIS-CALDERON et al., 2007).

Em estudo realizado na Turquia, com 254 amostras de soro bovino de corte de diferentes idades, foi detectado que 53,93% das amostras reagentes à virusneutralização foram positivas para bPIV-3 (YAVRU et al., 2005). Em 2009, Duman e colaboradores, realizaram pesquisa em animais leiteiros no mesmo país e observaram que dentre os cinco vírus respiratórios pesquisados (BoHV-1, BVDV, bPIV-3, BRSV e Adenovirus tipo 3), o bPIV-3 foi detectado em 92,8% (258/278) das amostras, pela prova diagnóstica de ELISA.

Na Colômbia a prevalência observada do vírus foi de 13,5% (22/128), sendo que a maior frequência ocorreu em animais acima de sete anos de idade, em rebanhos de exploração mista (corte e leite) e que apresentaram reabsorção embrionária (HURTADO et al., 2010).

Em estudo realizado na Bélgica, com a finalidade de detectar a prevalência dos patógenos respiratórios em bovinos, foram determinadas 24 afecções respiratórias. Dentre elas, as de origem bacterina e viral representaram 13,3% (31/233) dos animais estudados e apresentavam anticorpos para bPIV-3; o vírus estava presente em 53,3% dos rebanhos pesquisados (PARDON et al., 2011).

Na Arábia Saudita o vírus estava presente em 69,1% (318/460) das amostras de soro sanguíneo bovino reagentes à ELISA, tendo como principal associação em infecções mistas, o vírus BRSV (YOUSEF et al., 2013).

No Irã o vírus foi detectado em animais leiteiros da Província do Qazvin em 77,02% das 504 amostras de soro bovino, analisadas através da prova diagnóstica de ELISA indireta. Observou-se maior positividade em animais com quatro anos de idade (HATAMI et al., 2013).

O primeiro levantamento sorológico no Brasil foi no Estado de São Paulo, realizado por Candeias e Ribeiro (1968), que detectaram em 553 amostras, 36,71% reagentes a inibidores de hemoaglutinação. Em 1970, Candeias e Ribeiro, no mesmo Estado, realizaram estudo sorológico onde foram analisadas 902 amostras com 84,1% de positividade. No Rio Grande dos Sul a prevalência observada foi ainda maior, com 97% de reagentes positivos em 221 amostras de soro bovino. No mesmo Estado foi realizada a detecção de anticorpos para Vírus de Parainfluenza Bovina e Ovina, utilizando a técnica de hemoaglutinação indireta. Em um total de 393 e 205 amostras de soro sanguíneo bovino e ovino, respectivamente, detectaram-se 70% das amostras positivas para bovinos e 24% das amostras positivas para ovinos. Diagnosticou-se, assim, pela primeira vez, a presença do vírus na espécie ovina, no Brasil (DAL PIZZOL et al., 1989).

No estado da Bahia foram analisados 187 soros de bovinos com idade de um a quatro anos, sem antecedentes clínicos ou vacinação. Observaram-se 68,5% das amostras reagentes pela técnica de inibição de hemoaglutinação (SARDI et al., 2002).

Em 2011, o vírus foi detectado em ovinos, em São Paulo, na região de Botucatu. Através da técnica de virusneutralização, 82% (159/194) animais

testados foram reagentes (GONÇALVES et al., 2011). Os levantamentos sorológicos do bPIV-3 no Brasil, atualmente são escassos, o que mostra a necessidade de maiores estudos para melhor vigilância de nossos rebanhos.

Várias são as formas de diagnóstico do bPIV-3. Dentre elas pode-se citar a associação de sinais clínicos com o histórico, principalmente em casos de bovinos jovens com doenças respiratórias, porém, a confirmação do diagnóstico, é feita com o isolamento viral em cultivos celulares, que é o teste diagnóstico considerado como padrão ouro. Técnicas sorológicas como ELISA, inibição de hemoaglutinação e virusneutralizaçãotambém podem ser utilizadas para diagnóstico. Com a evolução das técnicas, o RT-PCR pode ser uma nova opção (FLORES, 2007).

Segundo Flores (2007), a prevenção da enfermidade deve ser baseada em medidas de higiene, manejo (evitar superlotação, mudança de temperatura brusca, falha na administração do colostro), controle do trânsito de animais, quarentena e vacinação. De forma geral as vacinas (vivas ou inativadas) para bPIV-3 vêm associadas com outros agentes virais e bacterianos, causadores de doenças respiratórias. A avaliação do custo/benefício da utilização da vacina, como forma de prevenção na situação epidemiológica que o Brasil se encontra foi pouco avaliada.

2.4 VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO

O Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) causa uma importante doença respiratória, caracterizada por broquiolite e pneumonia intersticial, acometendo principalmente animais jovens (SPILKI; ARNS, 2008). É considerado o agente mais frequente associado com afecções respiratórias graves, porém no Brasil, ainda são poucas as informações deste agente (AFFONSO et al., 2011).

O BRSV é da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus* (ICTV, 2013). Os vírus dessa família apresentam uma característica marcante, que é a fusão das células hospedeiras do vírus às células epiteliais, culminando na formação de células gigantes multinucleadas

(sincícios) (ARNS et al., 2007). Segundo Baker (1991), esses vírus tem semelhanças comuns com o vírus respiratório sincicial humano (HRSV) e os vírus respiratórios sinciciais ovino e caprino (ORSV e CRSV, respectivamente). Suas características comuns estão relacionadas com a organização genômica e estrutura viral (CRISTINA et al., 1998).

Este vírus é envelopado, possui três glicoproteínas, e entre elas se destacam a proteína F e a proteína G. A proteína F é responsável pela fusão, penetração do vírus nas células hospedeiras e células adjacentes e pela formação dos sincícios. A proteína G promove adesão do vírus à membrana celular do hospedeiro, ação semelhante ao das proteínas hemaglutinina e neuraminidase, durante as infecções pelo vírus bPI-3 (DORELEIJERS et al., 1996). Essas duas proteínas estruturais são importantes não apenas na patogenia da doença, mas também para o diagnóstico e a prevenção, uma vez que apenas anticorpos direcionados a elas são capazes de neutralizar o BRSV.

A variabilidade antigênica do BRSV permitiu sua classificação em três subgrupos: A, AB e B (ARNS et al., 2007). No Brasil ocorreu o isolamento do subgrupo B (ALMEIDA et al., 2007; ARNS et al., 2003; SPILKI et al., 2006).

A transmissão viral ocorre por via aerógena, pelo contato direto e proximidade dos animais (ARNS et al., 2007), podendo ainda ocorrer de forma indireta, por fômites recém-contaminados (BAKER et al., 1993).

Após a penetração nas vias respiratórias o BRSV replica-se nas células epiteliais das mucosas nasais, faringe, traqueia e pulmão (pneumócitos tipo II) sem causar efeito citopatogênico. A proteína F é o principal alvo da resposta imune ao BRSV, levando a uma intensa resposta do tipo Th2, com produção abundante de IL-4 e IL-10, induzindo a produção de anticorpos tipo IgE, que estimula o recrutamento de eosinófilos no parênquima pulmonar, explicando o quadro de bronquiolite (SPILKI; ARNS, 2008).

A ocorrência da doença está relacionada com fatores ambientais como a variação brusca de temperatura, e os surtos são relatados tanto no inverno (PEIXOTO et al., 2000) quanto no verão (DRIEMEIER et al., 1997). Os sinais clínicos ocorrem após incubação viral de três a cinco dias, tendo como principais sinais clínicos: apatia, anorexia, aumento de temperatura (maior que

39.5°C), corrimento nasal abundante, tosse, taquipneia, respiração bucal e abdominal, enfisema pulmonar e subcutâneo e, morte. Em muitos casos pode ser observado lacrimejamento, sialorreia, animais em posição ortopneica, dor ao toque da parede torácica e abdominal anterior (SPILKI; ARNS, 2008; PEIXOTO et al., 2000).

Estudos de prevalência são realizados para diagnosticar a situação da disseminação do vírus em todo mundo principalmente em países cuja produção de leite e carne se destaca. Em estudo realizado na Inglaterra e País de Gales foram coletadas amostras de tanques de leites de 1070 rebanhos e, em 100% dos rebanhos, foi detectada a presença de BRSV (PATON et al., 1998). Foram analisadas 1.102 amostras de soro bovino através do método de diagnóstico de ELISA, sendo reagentes 69,5% e 40,9% no sudeste e no noroeste dos Estados Unidos da América, respectivamente (GRUBBS et al., 2001).

Em estudo transversal realizado no Equador, com rebanhos leiteiros não vacinados, utilizando 2.367 amostras de soro bovino testado para ELISA indireto, observou-se que 80,48% das amostras reagentes ao teste diagnóstico e 91,3% dos rebanhos foram reagentes (SAA et al., 2012).

Na Arábia Saudita foi realizado levantamento sorológico em cinco distritos do país totalizando 460 amostras de soro bovino coletados no período de janeiro a março de 2011 e testado para ELISA. Reagiram ao teste diagnóstico 75,6% das amostras (YOUSEF et al., 2013).

Os primeiros a detectar o Vírus Respiratório Sincicial Bovino no Brasil foram Gonçalves et al. (1993), por meio de exame de imunofluorescência em cortes de tecido congelado e isolado a partir de pulmões de bezerros obtidos de frigoríficos no Rio Grande do Sul.

A infecção por BRSV está amplamente difundida no Brasil e estudos sorológicos indicam que o vírus está presente em mais de 95% dos bovinos do país, com mais de três anos de idade, sendo que 70% dos bezerros se infectam no primeiro mês de vida (ARNS et al., 2003). Porém, são poucos os estudos realizados para determinar a incidência ou prevalência de BRSV no Brasil. A frequência de animais com anticorpos contra BRSV foi relatada na região sul, nos Estados do Rio Grande do Sul (17,3 a 79%) e Paraná (80%); no

sudeste, nos Estados de São Paulo (74%), Minas Gerais (73%) e Rio de Janeiro (71%); e no Centro-Oeste, no Estado do Mato Grosso do Sul (57%) (DRIEMEIER et al., 1997; BARNIER, 1996). Arns (1996) realizou levantamento sorológico nos Estados do Rio Grande do Sul, de São Paulo e Minas Gerais, observando prevalência média de 84% de animais positivos para o teste de ELISA e, 87% dos animais positivos pela técnica de vírusneutralização.

O diagnóstico deve ser baseado na detecção de antígenos virais em amostras clínicas e, a outra opção diagnóstica seria a sorologia com detecção de anticorpos contra o vírus. Técnicas como a imunofluorescência e imunoperoxidase são utilizadas para detecção dos antígenos virais em amostras de pulmão. O isolamento viral é bastante trabalhoso devido à labilidade viral. Outro fato que pode atrapalhar para que o método de diagnóstico seja eficiente é a qualidade das amostras encaminhadas para o laboratório. Os métodos sorológicos utilizados são ELISA e vírusneutralização. Métodos moleculares podem ser utilizados como alternativa (ARNS et al., 2007).

Segundo Klem et al. (2013), a disseminação do BRSV entre os rebanhos e dentro do rebanho ocorre pela permanência de pequena porção de animais adultos positivos, os quais não apresentam sinais clínicos e são responsáveis pela reinfecção de todo o plantel. Portanto, o controle e prevenção desse vírus deve ser baseado em medidas de biossegurança, evitando entrada de animais positivos em rebanhos negativos e eliminação dos animais positivos. A vacina pode ser utilizada como forma de prevenção, porém não existem vacinas únicas para BRSV no mercado, somente em associações com outros vírus como BoHV-1, BVDV, bPIV-3 e, sua eficiência tem sido questionada (ARNS; SPILIKI, 2008).

3 OBJETIVOS

Tendo em vista que as doenças virais respiratórias têm grande relevância na bovinocultura brasileira, e que o estado do Paraná é um dos polos nacionais para a produção leiteira, esta pesquisa teve como objetivo:

- Realizar prevalência dos principais vírus respiratórios nos rebanhos leiteiros de raça de Holandesa variedade Preta e Branca (HPB), no Estado do Paraná:
 - Vírus da Diarreia Bovina (BVDV);
 - Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1);
 - Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 (bPIV-3);
 - Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV).
- Verificar a prevalência desses vírus nas regiões leiteiras do Estado do Paraná.
- Verificar a presença de coinfeção entre os animais dos rebanhos estudados.
- Verificar os fatores de risco relacionados com cada vírus estudado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu, sob o protocolo nº 220/20112 (Anexo I).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DO ESTUDO

O Estado do Paraná está localizado na Região Sul do Brasil, entre os paralelos de 22° 29' 30" e 26° 42' 59" de latitude sul, e entre as longitudes a Oeste de 48° 02' 24" e 54° 37' 38", compreendendo uma área de 199.307km². A temperatura média de 15 a 24°C com precipitações de 1.200 a 3.500mm e umidade relativa do ar de 56 a 85%. O Estado pode ser dividido em dois tipos de clima, o subtropical e o temperado. O rebanho leiteiro bovino do Paraná é composto por 2.852.264 bovinos e cerca de 51% destes são considerados da raça Holandesa, sendo esta a raça leiteira com maior frequência no estado (IPARDES, 2008).

4.3 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho amostral foi determinado segundo Agranonik e Hirakata (2011), considerando o tamanho da população desconhecido, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$n = p \cdot (1-p) \cdot Z^2 / E^2$$

Onde:

n = número de amostras a serem utilizadas

Z = fator determinante do grau de confiança (1,96)

p = prevalência esperada

E = margem de erro admissível

Como prevalência esperada admitiu-se a menor prevalência encontrada entre os quatro vírus estudados dentro do estado do Paraná, que foi de 27,1% (BARROS FILHO et al., 1997), erro aceitável de 5%, nível de confiança de 95% e DEFF (*Design Effect*) de 1,5. Totalizando o número amostral mínimo de 455 amostras.

4.4 ANIMAIS

Foram utilizados 714 bovinos, fêmeas, da raça HPB, com idade superior a seis meses, provenientes de 26 propriedades leiteiras, distribuídas em 17 municípios do Estado do Paraná.

No Paraná, três bacias se destacam na produção de leite: Centro-Oriental, Oeste e Sudoeste. Estas três bacias envolvem 95 municípios, concentram 48,5% dos produtores e são responsáveis por 53% da produção estadual de leite. As demais regiões do estado são englobadas como uma única região (IPARDES, 2008).

A escolha das propriedades seguiu o critério de inclusão amostral e a divisão do Paraná citada anteriormente. Todas as propriedades realizavam exames de Brucelose e Tuberculose Bovina periódicos, vacina de brucelose nas fêmeas de 3 a 8 meses, ordenha mecânica duas vezes ao dia e média de produção leiteira de 20 litros/vaca/dia. A Figura 3 demonstra distribuição dos municípios e regiões amostradas, onde foram realizadas as coletas das amostras. A Tabela 4 demonstra o número de propriedades coletadas em cada município, o número de amostras coletadas em cada município.

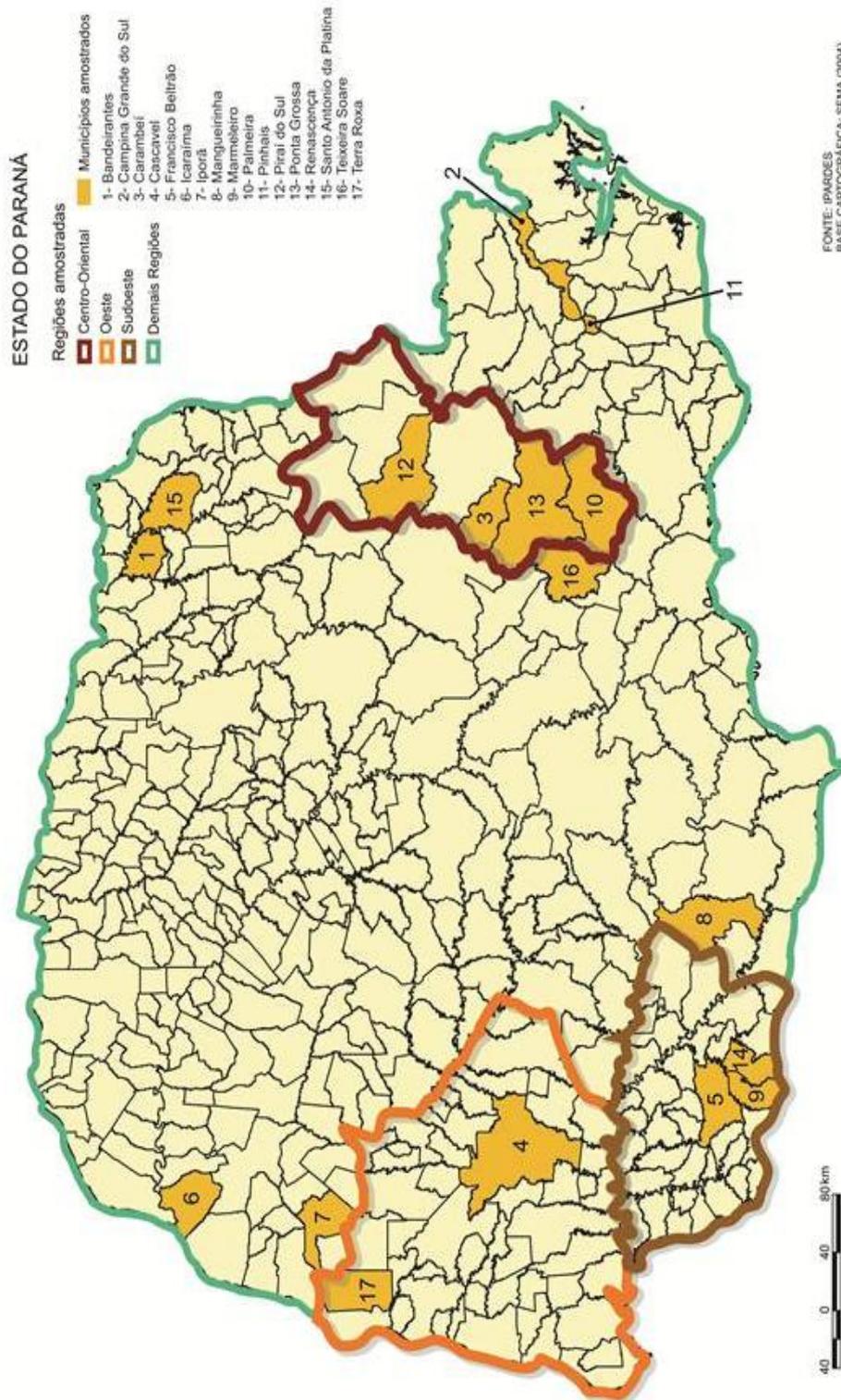


FIGURA 3 - Localização geográfica dos municípios participantes da pesquisa dentro do Estado do Paraná.

TABELA 4 - Distribuição da coleta das amostras por região amostral e por município coletado

<i>Regiões</i>	<i>Municípios</i>	<i>Número de propriedades coletadas por município</i>	<i>Número de amostras coletadas por município</i>
Sudoeste	Francisco Beltrão	2	27
	Marmeleiro	1	50
	Renascença	2	25
Oeste	Cascavel	2	39
	Terra Roxa	2	27
Centro-Oriental	Carambeí	2	63
	Palmeira	2	116
	Ponta Grossa	1	38
	Piraí do Sul	3	112
Demais Regiões	Bandeirantes	1	11
	Campina Grande do Sul	1	36
	Icaraíma	1	8
	Iporã	1	31
	Mangueirinha	1	27
	Pinhais	1	40
	Santo Antônio da Platina	2	38
	Teixeira Soares	1	26
	TOTAL	-	26

4.5 DESENHO DO ESTUDO

O estudo foi conduzido durante o período janeiro de 2007 a dezembro de 2012. As propriedades que participaram da pesquisa foram identificadas de 1 a 26 e escolhidas de forma não aleatória, pois seguiram os critérios de inclusão amostral. As amostras de sangue foram colhidas de forma aleatória, sendo que foi coletado no mínimo 10% dos animais existentes em cada propriedade.

4.6 CRITÉRIO DE INCLUSÃO AMOSTRAL

As amostras analisadas originaram-se de rebanhos leiteiros compostos por animais da raça HPB, com idade maior que seis meses, para evitar a interferência de anticorpos colostrais (TIZARD, 2012), e sem histórico de uso de vacinas de vírus vivos ou mortos, para os vírus respiratórios estudados.

4.7 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostra de sangue total de cada animal foi obtida pela punção da veia jugular, empregando-se o sistema a vácuo em tubo siliconizado de 10mL, sem anticoagulante. Após a formação do coágulo sanguíneo, as amostras foram centrifugadas a 600 x G por 15 minutos e o soro resultante foi armazenado em microtubos identificados, com capacidade de 1,5mL. Os microtubos foram mantidos a -20°C e posteriormente transportados até Laboratório de Virose de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo (LVB-IB).

No laboratório, as amostras de soro foram armazenadas a -20° C até o momento do processamento. Antes da realização do teste de virusneutralização (VN) os soros foram colocados em banho-maria a 56°C por 30 minutos para a inativação do complemento.

4.8 FATORES DE RISCO

Os proprietários e/ou responsáveis pelas propriedades foram entrevistados, por meio da aplicação de questionário estruturado (Anexo II), com intuito de se avaliar a propriedade quanto às seguintes variáveis: tipo de sistema de produção, número de animais na propriedade, lotação, área da propriedade, monta natural, inseminação artificial, reutilização de agulhas e seringas e reutilização de luva de palpação, participação em feiras e/ou exposições, compartilhamento de pasto com vizinhos, percentual de entrada e

saída de bovinos. Com os dados relativos à movimentação dos animais calculou-se o percentual de entrada e saída de bovinos do rebanho, por meio de uma operação simples de regra de três.

4.9 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

As amostras de soro foram submetidas ao teste de vírusneutralização, contra BoHV -1, BVDV e BRSV de acordo com as orientações do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2013) e contra o bPIV-3, de acordo com recomendações do Code of Federal Regulation (CFR, 2013). As etapas de procedimentos laboratoriais como: manutenção das culturas de células, multiplicação de vírus padrões, titulação viral e validação da reação foram efetuadas segundo a metodologia empregada no Laboratório de Viroses de Bovinos do Instituto Biológico de São Paulo (PITUCO, E. M.- comunicação pessoal).

4.9.1 Manutenção das culturas celulares

A linhagem celular CCL-22, Madin & Darby Bovine Kidney - MDBK (proveniente da “American Type Culture Collection” (ATCC), Manassas, EUA, livre de *Pestivirus*) foi utilizada para a reação de VN em microplacas e para a multiplicação das estirpes virais em garrafas de poliestireno para cultivo celular.

As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo (MEM – Cultilab, Campinas, Brasil), acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), tamponado com 25 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanossulfônico (HEPES – Biosolve, Westford, EUA) e suplementado com 5% de soro fetal bovino livre de anticorpos contra BVDV (SFB – Cultilab, Campinas, Brasil). Para a manutenção, as células foram cultivadas em frascos de poliestireno, com 150cm² de área (Corning, New York, EUA) e mantidas em estufa a temperatura de 37°C.

Os subcultivos foram realizados a cada 72 horas, utilizando uma solução Tripsina-Versene (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) para a desagregação das células. O inóculo celular foi constituído de 2×10^5 células/mL e a contagem feita em câmara de Neubauer (Optik Labor, Friedrichshofen, Alemanha). As células e o SFB foram controlados periodicamente para presença de *Pestivirus* por reação de Imunoperoxidase Direta, ELISA Antígeno (IDEXX, Westbrook, EUA) e a Transcrição Reversa combinada à Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).

4.9.2 Estirpes Virais

Para a realização das reações de VN foram utilizadas as seguintes estirpes:

1. BVDV-1 NADL, isolado na “*National Animal Disease Laboratory*” (ATCC® VR-534™), cedida gentilmente pelo Instituto de Virologia da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha.
2. BoHV-1, (ATCC® VR-188™) estirpe “Los Angeles” cedida gentilmente pelo Instituto de Virologia da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha;
3. bPIV-3, adquirida da “*American Type Culture Collection*” (ATCC® VR-281™);
4. BRSV, adquirida da “*American Type Culture Collection*” (ATCC® VR-1485™).

4.9.3 Multiplicação dos vírus padrões

A produção das suspensões virais destinadas à utilização nas reações de VN foi realizada inoculando-se 1mL de vírus em garrafa, contendo

monocamada pré-formada (24 horas) de células MDBK. O inóculo foi incubado em estufa com 5% de CO₂ e umidade controlada, a 37°C por 1h para adsorção nas células. Após a incubação foi acrescentado meio de crescimento com 1% de antibióticos: Penicilina G Potássica 11.200 UI/mL, Estreptomicina 0,01 g/mL, Gentamicina 0,01 g/mL, L-Glutamina 0,029 g/mL e Anfotericina B 0,5 mg/mL (Cultilab®, Campinas, Brasil), e novamente incubado. Os cultivos de células foram observados diariamente até o aparecimento de efeito citopático do vírus. Quando este efeito atingiu cerca de 90% da monocamada celular, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado em tubos estéreis a 600 x G por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a suspensão viral foi distribuída em tubos de criogenia (TPP, *Techno Plastic Products AG*®, Switzerland), sendo 1mL por tubo, identificados com o tipo de vírus e partida, e armazenados em ultrafreezer (*Thermo Electron Corporation*, Waltham, EUA) à temperatura de -86°C ou em nitrogênio líquido à -196° C até o momento da utilização. Uma dessas alíquotas foi descongelada e submetida à titulação viral.

4.9.4 Titulação viral

Para determinação do título do vírus, as partidas foram testadas em oito diluições seriadas de razão dez (10^{-1} a 10^{-8}) em meio MEM com 1% de antibióticos. Foram distribuídas em microplaca de fundo chato (TPP, *Techno Plastic Products AG*®, Switzerland) 50µL das diluições do vírus e 50µL de suspensão de células MDBK, na concentração de 3×10^6 células/mL. A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e umidade controlada. A leitura foi efetuada 96 horas após a incubação com a utilização de microscópio invertido. O cálculo do título viral foi realizado pelo método de Reed e Muench (1938).

4.9.5 Pesquisa de anticorpos neutralizantes – Teste de Vírusneutralização

Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno, fundo chato, de 96 cavidades (*TPP Techno Plastic Products AG*[®], Switzerland). Na análise qualitativa, realizada como triagem, cada soro foi testado na diluição recomendada como ponto de corte para cada vírus, assim, para BoHV-1 e BRSV foram utilizadas diluição 1:2, para BVDV foram utilizadas diluição 1:10 (OIE, 2013) e para bPIV-3 foram utilizadas diluição 1:2 (CFR, 2013). As amostras foram examinadas em quadruplicata sendo 22 soros por placa. Em cada cavidade da placa foi adicionado 50µL do soro teste e 50µL da suspensão de vírus contendo 200 TCID₅₀/50µL, excetuando-se a primeira coluna de cada placa, utilizada para controle celular, que não recebeu amostra de soro teste ou de vírus, mas apenas 100µL de meio MEM. Além das placas onde foram analisados os soros teste, foi reservada uma placa para diluição dos soros controle da reação, sendo adicionados nas linhas A e B o soro controle forte positivo (C+++), linhas C e D o soro controle positivo (C++), linhas E e F o soro controle fraco positivo (C+) e linhas G e H o soro controle negativo. Foram realizadas diluições seriadas na razão dois (ex 1:2 até 1:2048), em meio MEM. Em seguida, foi acrescentado a cada cavidade com soro já diluído, 50µL de suspensão de vírus contendo 200 TCID₅₀/50µL, sendo que, assim como nas demais placas, a primeira coluna foi reservada para controle celular. A mistura soro/vírus foi incubada de acordo com o recomendado: BoHV-1 por um período de 18 a 24h e os demais vírus por aproximadamente duas horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada. Após a incubação, foi adicionada em cada cavidade, 100µL (para BoHV-1) ou 50µL (para BVDV, bPIV-3 e BRSV) de suspensão de células MDBK, na concentração de 3 x 10⁶ células/mL.

Terminada essa etapa, a microplaca foi novamente incubada à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ por um período de 72 horas, seguida de leitura do efeito citopático característico. A interpretação do resultado foi a seguinte:

- Se nenhuma ou somente uma cavidade foi neutralizada, o soro foi considerado “não reagente”;
- Se duas ou mais cavidades foram neutralizadas a amostra foi submetida à titulação.

Em cada prova foi incluída uma placa para retitulação do vírus, utilizada como controle do título da suspensão viral. Nesta placa foram incluídas quatro diluições de razão 10 do vírus (oito repetições por diluição em duplicata), além de duas colunas reservadas para controle de célula. O cálculo do título foi realizado pelo método de Reed e Muench (1938). Além da placa de retitulação, foi incluída também uma placa para controle de doses virais, onde foram acrescentadas 10 doses diferentes do vírus (oito repetições por dose), compreendendo a faixa para validação do teste para todos os vírus estudados (20 a 400 TCID₅₀/100µL), diluídas na razão dois. Após incubação por 72h em estufa com 5% de CO₂, a 37°C, com umidade controlada, efetuou-se leitura dos testes em microscópio invertido, pelo monitoramento do efeito citopático (ECP). Nos testes qualitativos, a ausência de ECP indicou a neutralização viral na diluição utilizada (ponto de corte de cada vírus), e a presença de ECP mostrou a ausência de anticorpos neutralizantes.

As amostras submetidas ao teste quantitativo, realizado para titulação dos anticorpos presentes em cada soro, foram diluídas em meio MEM, na razão dois (iniciando no ponto de corte de cada vírus, por exemplo, 1:4 até 1:512), sendo testado por microplaca um total de cinco soros (em duplicata). Após a diluição, assim como na análise qualitativa, foi acrescentado em cada cavidade com soro diluído, 50µL de suspensão de vírus contendo 200 TCID₅₀/50µL, seguido da incubação recomendada para cada vírus, adição de 100µL (para BoHV-1) ou 50µL (para BVDV, bPIV-3 e BRSV) da suspensão de células (3 x 10⁶ células/mL) e nova incubação de 72h. Foram incluídas em cada prova quantitativa uma placa para os soros controle, uma placa de retitulação viral e outra de controle de doses virais. O cálculo do título viral foi realizado segundo o método de Spearman-Kärber (FINNEY, 1964).

4.9.6 Validação da reação

A verificação dos itens abaixo se fez necessária para a validação dos testes de virusneutralização realizados:

- Controle de célula para certificar a ausência de alterações morfológicas;
- Análise da placa de retitulação (REED; MUENCH, 1938) para a confirmação do título viral da estirpe utilizada e das doses infectantes obtidas na prova, que devem situar-se entre 20 a 400 TCID₅₀/100µL, de acordo com o vírus (OIE, 2013);
- Os títulos de anticorpos dos soros controle C+++ , C++ e C+ que devem manter-se iguais ao previamente conhecido, não apresentando variações maiores ou menores que 0,3 log;
- As amostras reagentes no teste qualitativo que serão submetidas ao teste quantitativo, para obtenção do título de anticorpos;
- Amostras de soro com títulos iguais ou superiores aos recomendados pela OIE que serão consideradas reagentes;
- Quando os parâmetros de controle não fossem atendidos os resultados do respectivo ensaio foram descartados e os soros retestados.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados foram utilizados os testes do Qui-quadrado e Exato de Fisher (SNEDECOR; COHRAN, 1980). Os dados obtidos neste estudo foram expressos por meio da prevalência de ocorrência de bovinos portadores de anticorpos contra os vírus pesquisados. O nível de significância foi fixado em 5%.

Após os dados estarem tabulados, as variáveis foram analisadas por meio da regressão logística. Dentre os resultados obtidos desta análise observa-se o Odds ratio (OR), que é definido como a razão entre a chance de um evento ocorrer em um grupo e a chance de ocorrer em outro grupo. De acordo com Hair et al. (2009), este tipo de análise explica as variáveis que são qualitativas (ou categóricas) e tem a vantagem de ser menos afetadas, quando a variável em estudo não está com distribuição normal. O modelo de regressão logística analisa um conjunto de variáveis independentes quantitativas (ou não categórica), para tentar prever uma variável dependente categórica (PEREIRA et al., 2011). Neste trabalho, a ocorrência de bovinos sororreagentes ou não ao teste diagnóstico foi classificada como uma variável dependente, do tipo dicotômica (0 – negativos/1 – positivos) e as demais variáveis foram classificadas como variáveis quantitativas explicativas. Ao final do ajuste, foi calculada a sensibilidade (proporção de verdadeiros positivos) e especificidade (proporção de verdadeiros negativos) que foram demonstrados por meio da curva ROC (Receiver Operator Characteristic Curve).

Somente os dados que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para análise univariada para cada vírus estudado foi incluído posteriormente na análise de regressão logística e conseqüentemente expostos nos resultados e na discussão.

5 RESULTADOS

5.1 PREVALÊNCIA DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ENCONTRADOS EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA VARIEDADE PRETA E BRANCA CRIADOS NO ESTADO DO PARANÁ

A prevalência de animais reagentes nas 714 amostras de soro bovino da raça HPB colhidas em propriedades leiteiras do estado do Paraná foi de 93,5% para o BRSV (668/714), de 80,4% para o bPIV-3 (574/714) , de 35,8% para o BVDV (256/714) e de 22,3% (159/714) para BoHV-1 (TABELA 5).

TABELA 5 - Resultado da virusneutralização para os vírus respiratórios Herpesvírus Bovino 1, Vírus da Diarreia Viral Bovina, Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3, Vírus Respiratório Sincicial Bovino em bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca, não vacinados e criados no Estado do Paraná, utilizando o método de diagnóstico de virusneutralização.

VÍRUS	n	VIRUSNEUTRALIZAÇÃO		SOROPREVALÊNCIA
		+	-	%
BoHV-1	714	159	555	22,3
BVDV	714	256	458	35,8
bPIV-3	714	574	140	80,4
BRSV	714	668	46	93,5

n= Número de animais amostrados

5.2 PREVALÊNCIA DOS CASOS ISOLADOS E DE COINFEÇÃO ENTRE OS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ESTUDADOS

Dentre as possibilidades de coinfeção dos agentes virais respiratórios estudados (BoHV-1, BVDV, bPIV-3 e BRSV) foi detectado que a maior prevalência de coinfeção ocorreu na associação dos vírus bPIV-3 e BRSV observada em 37,1% (265/714), seguida da associação dos vírus BVDV, bPIV-

3 e BRSV presente em 19,5% (139/714) das amostras, e a associação dos quatro vírus estudados, sendo esta observada em 13,4% (96/714) das amostras. Ocorreram também outras associações de vírus, porém todas com frequência menor que 10% das amostras.

O agente viral que ocorreu de forma isolada com maior prevalência foi o BRSV, com 13,3% (95/714) das amostras positivas. A prevalência de animais que não se apresentaram soropositivos para nenhum vírus estudado foi de 2,4% (17/714) e, a prevalência de bovinos sororreagentes a pelo menos um dos vírus respiratórios estudados foi de 97,6% (697/714). Os dados relativos às coinfeções e as prevalências de amostras positivas para vírus respiratórios analisadas encontram-se resumidas na Tabela 6.

A partir dos dados existentes na Tabela 6 observou-se que a probabilidade de ocorrer infecção isolada por BRSV é 4 vezes maior que a probabilidade de ocorrer infecção isolada pelo bPIV-3, 47 vezes maior de ocorrer a infecção isolada por BVDV e por fim 95 vezes maior que ocorrer infecção isolada por BoHV-1.

TABELA 6 - Distribuição dos casos isolados e de coinfeção entre os quatros vírus respiratórios nas amostras de soro analisadas de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca, não vacinados criados no Paraná, utilizando o método de diagnóstico de virusneutralização.

<i>Infecção</i>	<i>Número de Amostras</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
BoHV-1 + BVDV + bPIV-3 + BRSV	96	13,4
BoHV-1 + BVDV + bPIV-3	2	0,3
BoHV-1 + bPIV-3+ BRSV	47	6,6
BVDV + bPIV-3 + BRSV	139	19,5
BoHV-1 + BRSV	14	1,9
BVDV + bPIV-3	5	0,7
BVDV + BRSV	12	1,7
bPIV-3 + BRSV	265	37,1
Único Agente	117	16,4
<i>BoHV-1</i>	0	0,0
<i>BVDV</i>	2	0,3
<i>bPIV-3</i>	20	2,8
<i>BRSV</i>	95	13,3
Ausente	17	2,4
<i>Total</i>	714	100,0

5.3 PREVALÊNCIA DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS CONFORME AS PROPRIEDADES ESTUDADAS

Das propriedades estudadas 100%, 96,1%, 88,5% e 65,3% apresentaram animais positivos para BRSV, bPIV-3, BVDV e BoHV-1, respectivamente. Os

dados relativos à soroprevalência dos vírus respiratórios nas propriedades estudadas encontram-se resumidos na Tabela 7.

TABELA 7 - Resultado de soropositividade dos vírus respiratórios estudados em propriedades leiteiras da raça Holandesa variedade Preta e Branca, criados no estado do Paraná, utilizando o método de diagnóstico de virusneutralização.

VÍRUS	Número de propriedades	Virusneutralização		Prevalência dos rebanhos %
		+	-	
BoHV-1	26	17	9	65,3
BVDV	26	23	3	88,5
bPIV-3	26	25	1	96,1
BRSV	26	26	0	100,0

5.4 PREVALÊNCIA DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ESTUDADOS NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DE LEITE DO ESTADO (SUDOESTE, OESTE, CENTRO ORIENTAL) E DEMAIS REGIÕES E A ASSOCIAÇÃO DE BOVINOS SORORREAGENTES AOS QUATRO VÍRUS PESQUISADOS

Houve relação significativa ($p < 0,05$) entre a existência de bovinos sororreagentes aos vírus BoHV-1, BVDV e BRSV e as regiões estudadas e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o bPIV-3. Os vírus BoHV-1 e BRSV foram mais frequentes na região Oeste, com 56,06% (37/66) e 98,48% (65/66), respectivamente. O BVDV e bPIV-3 apresentaram maior prevalência na região Centro Oriental, com 47,41% (156/329) e 82,07% (270/329), respectivamente (Tabela 8).

TABELA 8 – Prevalência de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca sororreagentes aos quatro vírus respiratórios estudados conforme as regiões do estado do Paraná estudadas.

<i>Regiões</i>	<i>N</i>	<i>BoHV-1(%)^a</i>	<i>BVDV (%)^b</i>	<i>bPIV-3 (%)^a</i>	<i>BRSV (%)^a</i>
Sudoeste	102	21 (20,6) ^c	23 (22,5) ^c	82 (80,4) ^d	91 (89,2) ^c
Oeste	66	37 (56,1) ^c	24 (36,4) ^c	53 (80,3) ^d	65 (98,5) ^c
Centro Oriental	329	59 (17,9) ^c	156 (47,4) ^c	270 (82,7) ^d	316 (96,0) ^c
Demais Regiões	217	42 (19,4) ^c	53 (24,4) ^c	169 (77,9) ^d	196 (90,4) ^c

^aNúmero de animais positivos e prevalência (Títulos ≥ 2) baseado nas variáveis estudadas;

^bNúmero de animais positivos e prevalência (Títulos ≥ 10) baseado nas variáveis estudadas;

^cValor de $p < 0,05$ pelo Teste Qui-quadrado;

^dValor de $p > 0,05$ pelo Teste Qui-quadrado.

5.5 HERPESVÍRUS BOVINO 1

5.5.1 Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BoHV-1 conforme a faixa etária dos animais

Houve diferença significativa entre as faixas etárias estudadas, sendo que o número de animais soropositivos aumentou conforme a idade dos animais avançou. A maior prevalência de animais soropositivos foi observada entre os bovinos de mais de 48 meses (35,78%), seguida dos animais da faixa etária de 25 a 48 meses (20,52%) e dos bovinos com idade de sete a 24 meses (7,53%).

TABELA 9 - Prevalência de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca soropositivos para Herpesvírus Bovino 1, conforme a faixa etária estudada.

<i>Faixa etária (meses)</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de soropositivos</i>	<i>Prevalência (%)</i>
7 a 24	239	18	7,53 ^a
25 a 48	190	39	20,52 ^b
>48	285	102	35,78 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.5.2 Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BoHV-1 conforme o manejo

Com relação aos fatores de risco associados ao manejo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a utilização ou não de monta natural, reutilização de luvas de palpação e compartilhamento de pasto com vizinhos e animais sororreagentes ao BoHV-1. Nas propriedades que utilizavam monta natural como forma de cobertura, os bovinos apresentaram prevalência de 25,29% (128/528). Quanto à reutilização de luvas de palpação, a prevalência de animais soropositivos foi de 26,37% (154/584) e, nas propriedades cujos bovinos compartilhavam pasto, a prevalência de animais soropositivos foi de 31,01% (58/187).

TABELA 10 - Prevalência de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca soropositivos para Herpesvírus Bovino 1 conforme os tipo de manejos: monta natural, reutilização luva de palpação e compartilhamento de pasto com vizinhos.

Manejo		Nº de animais	Animais Soropositivos	
			Número	Prevalência (%)
Monta natural	Sim	508	128	25,29 ^a
	Não	206	31	15,05 ^b
Reutilização de luva de palpação	Sim	584	154	26,37 ^a
	Não	130	5	3,84 ^b
Compartilhamento de pasto com vizinhos	Sim	187	58	31,01 ^a
	Não	527	101	19,16 ^b

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

5.5.3 Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BoHV-1 conforme às características das propriedades e a movimentação de animais

Observou-se relação significativa entre os bovinos sororreagentes e o número total de animais da propriedade, a área total em hectares, a lotação e o percentual de entrada dos animais, conforme dados resumidos na Tabela 10.

Com relação ao número total de animais de cada propriedade, observou-se neste estudo maior prevalência de animais soropositivos, quando nas propriedades a quantidade de animais era maior que 100 bovinos (31,98% - 55/172).

Considerando a área das propriedades estudadas em hectares, observou-se que a prevalência de animais soropositivos diminuiu conforme aumentava o tamanho da propriedade, sendo maior em propriedades com área menor ou igual a 25 hectares (39,21% - 81/206) e, menor, em propriedades com área superior a 50 hectares (1,96% - 2/102).

Quanto à lotação de animais por hectare, os resultados deste estudo demonstraram que, quanto maior a quantidade de bovinos por hectare, maior a

prevalência de animais positivos para BoHV-1, com prevalências mais elevadas em propriedades com lotação maior que três animais por hectare (58,14% - 132/227) e, diminuídas, em propriedades com três bovinos por hectare (31,39% - 27/86). Nenhum animal soropositivo foi encontrado em propriedades com lotação inferior ou igual a dois animais por hectare (0,00% - 0/300).

Neste estudo, ao avaliar o percentual de entrada de bovinos na propriedade observou-se que quando este era maior do que 10% dos animais, a prevalência de bovinos sororreagentes era maior, chegando a 34,69% (68/198).

TABELA 11 - Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Herpesvírus Bovino 1 conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.

<i>Variáveis</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de animais Sororreagentes</i>	<i>Prevalência (%)</i>	
Número de animais na propriedade	≤ 50	83	22	26,51 ^a
	51 a 100	459	82	17,86 ^b
	>100	172	55	31,98 ^c
Área da propriedade (hectares)	≤25	206	81	39,32 ^a
	26 a 50	247	76	30,76 ^b
	>50	102	2	1,96 ^c
Lotação de animais por hectare	≤2	300	0	0,00 ^a
	3	86	27	31,39 ^b
	>3	227	132	58,14 ^c
Percentual de entrada de animais	≤ 5%	360	88	24,44 ^a
	6% a 10%	158	3	1,89 ^b
	>10%	196	68	34,69 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.5.4 Modelo de regressão logística para o BoHV-1

Foi possível verificar que o modelo ajustado foi considerado significativo ($r^2=0,582$; AIC = 441,093; $p<0,0001$), sendo que as variáveis analisadas foram: número de animais, área da propriedade, lotação, idade, percentual de entrada de animais e reutilização de luva de palpação (Tabela 12).

A partir deste modelo, verificou-se que na variável número de animais existentes nos rebanhos, as propriedades com maior que 50 e menor ou igual a 100 animais apresentaram um caráter protetor à disseminação do vírus (OR=0,243; IC95% 0,116 – 0,507).

Bovinos pertencentes às propriedades com áreas entre 26 a 50 hectares apresentaram 11 vezes mais chances de ser infectados pelo Herpes Vírus Bovino Tipo 1, quando comparados com os bovinos pertencentes a propriedades com áreas maiores que 50 hectares (OR=11,328; IC95% 2,482 – 51,697).

Quanto à lotação verificou-se que, em propriedades onde a lotação de bovinos por hectare era maior que três bovinos, os animais apresentaram 1,026 chances de estarem infectados, do que em propriedades onde a lotação era menor ou igual a dois bovinos por hectare (OR=1,026; IC95% 0,370 – 2,847).

Com relação a variável idade dos animais notou-se que os animais classificados com idade maior que 48 meses apresentaram 15 vezes mais chances de estarem infectados do que os animais mais jovens (OR=15,012; IC95% 7,500 – 30,051).

Considerando-se o percentual de entrada de animais nas propriedades, constatou-se que em rebanhos onde a entrada era maior que 10% de bovinos houve 52,52 vezes mais risco de ocorrer a infecção pelos vírus do que em propriedades com entradas seis a 10% de animais (OR=52,520; IC95% 13,269 – 207,876).

Por fim, com relação à variável reutilização da luva de palpação, as propriedades onde esse manejo não era empregado apresentaram um fator

protetor para a disseminação viral entre os animais de OR=0,123 (IC95% 0,041 – 0,369).

TABELA 12 - Coeficientes (valor) e Odds ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o Herpesvírus Bovino 1.

<i>Variáveis</i>	<i>Valor</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>Pr > Qui²</i>	<i>OR (IC95%)</i>	
Intercepto	-8,498	1,166	< 0,0001		
Número de animais da propriedade	>100	0,000	0,000		
	51 a 100	-1,417	0,377	0,000	0,243 (0,116 – 0,507)
	≤ 50	-0,508	0,578	0,380	0,602 (0,194 – 1,869)
Área da propriedade (hectare)	>50	0,000	0,000		
	≤25	1,340	0,979	0,171	3,819 (0,560 – 26,037)
	26 a 50	2,427	0,775	0,002	11,328 (2,482 – 51,697)
Lotação de animais por hectare	≤2	0,000	0,000		
	3	-4,792	1,124	< 0,0001	0,008 (0,001 – 0,075)
	>3	0,026	0,521	0,961	1,026 (0,370 – 2,847)
Idade (meses)	7 a 24	0,000	0,000		
	25 a 48	2,045	0,394	< 0,0001	7,729 (3,568 – 16,743)
	>48	2,709	0,354	< 0,0001	15,012 (7,500 – 30,051)
Percentual de entrada de animais	6% a 10%	0,000	0,000		
	>10%	3,961	0,702	< 0,0001	52,520 (13,269-207,876)
	≤5%	2,543	0,701	0,000	12,713 (3,218 – 50,227)
Reutilização luva de palpação	Sim	0,000	0,000		
	Não	-2,098	0,562	0,000	0,123 (0,041 – 0,369)

Por meio da elaboração da Receiver Operator Characteristic Curve (ROC), verificou-se que a explicabilidade do modelo é de 92,0%, sendo sua

especificidade equivalente a 92,43% (percentual de acerto do diagnóstico negativo, ou seja, o verdadeiro negativo), e sua sensibilidade equivalente a 69,18% (percentual de acerto do diagnóstico positivo, ou seja, o verdadeiro positivo) (Figura 4).

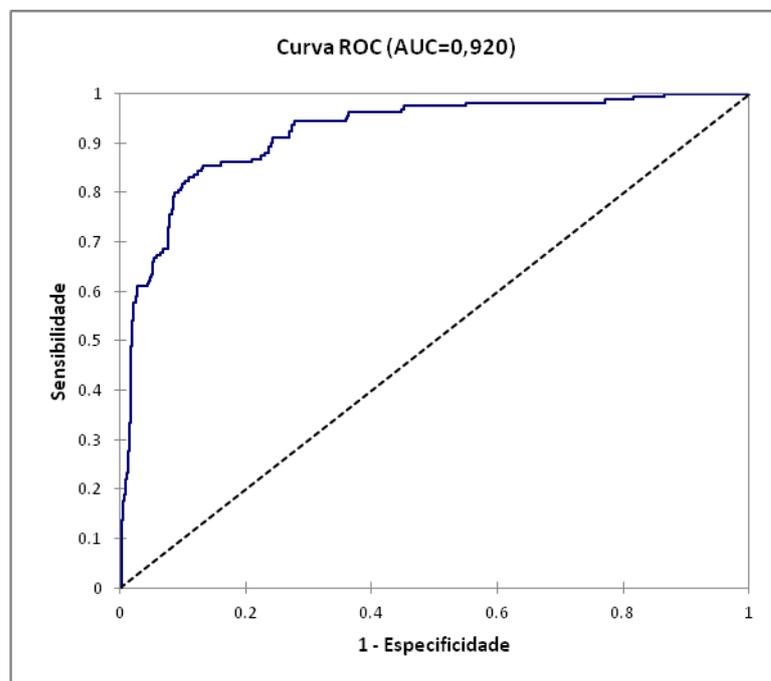


FIGURA 4 - Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Herpesvírus Bovino 1.

5.6 VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

5.6.1 Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme os sistemas de produção

Com relação ao sistema de produção utilizado em cada propriedade observou-se que bovinos criados em sistema intensivo apresentaram maior prevalência de BVDV (84,15%) que animais que foram criados em sistema semi-intensivo (30,00%) e extensivo (15,11%) (Tabela13).

TABELA 13 - Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Diarreia Viral Bovina conforme os sistemas de produção

<i>Sistema de Produção</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de soropositivos</i>	<i>Prevalência (%)</i>
Extensivo	86	13	15,11 ^a
Semi-Intensivo	527	158	30,00 ^b
Intensivo	101	85	84,15 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.6.2 Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme a idade dos bovinos estudados

Houve maior prevalência de animais positivos ao teste de VN entre os animais pertencentes a faixa etária 25 a 48 meses de idade (41,05% - 78/190).

TABELA 14 - Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Diarreia Bovina conforme a faixa etária dos bovinos estudados

<i>Faixa etária (meses)</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de soropositivos</i>	<i>Prevalência (%)</i>
7 a 24	239	67	28,03 ^a
25 a 48	190	78	41,05 ^b
>48	285	111	38,94 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.6.3 Prevalência de bovinos reagentes ao BVDV conforme o manejo

Nesse estudo observou-se que a prática de realização de inseminação artificial apresentou prevalência de 37,29% (247/664) de animais soropositivos, enquanto que o hábito da reutilização de luvas de palpação a prevalência foi de 42,16% (248/584) para o vírus estudado. Nas propriedades onde os animais tem como manejo o compartilhamento de pasto com vizinhos, os bovinos apresentaram prevalência de positividade de 43,31% (81/187) (Tabela 15).

TABELA 15 - Prevalência de bovinos reagentes ao Vírus da Diarreia Viral Bovina conforme o manejo.

<i>Tipo de Manejo</i>		<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de animais Sororreagentes</i>	<i>Prevalência (%)</i>
Inseminação artificial	Sim	664	247	37,29 ^a
	Não	50	9	18,00 ^b
Reutilização de luva de palpação	Sim	584	248	42,46 ^a
	Não	130	8	6,15 ^b
Compartilhamento de pasto com vizinhos	Sim	187	81	43,31 ^a
	Não	527	175	33,20 ^b

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

5.6.4 Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme as características das propriedades e a movimentação de animais

O estudo detectou que a prevalência de bovinos sororreagentes ao BVDV foi mais elevada nas propriedades com maior número de animais, sendo 72,09% (172/124) a maior prevalência observada em propriedades mais de 100 animais (Tabela 16).

Com relação à área da propriedade, foi observado que propriedades com mais de 50 hectares apresentaram prevalência de positivos de 63,57% (89/104), seguidas de propriedades com menor ou igual a 25 hectares e de 26 a 50 hectares, com prevalências de 31,36% (90/287) e 23,62% (77/323), respectivamente (Tabela 16).

Considerando o percentual de entrada de animais na propriedade, os resultados desse estudo demonstraram que quanto maior o percentual de entrada, maior a frequência de animais positivos para BVDV, com prevalências mais elevadas em propriedades com percentual de entrada maior que 10% (56,12% - 110/196) e menores, em propriedades com percentual de entrada de menor ou igual a 5% (99/360 - 25%). Fato semelhante aconteceu com o percentual de saída dos animais da propriedade, sendo observado que a prevalência de bovinos soropositivos se elevou conforme aumentava o

percentual de saída de animais da propriedade, dados que se encontram resumidos na Tabela 16.

TABELA 16 - Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Diarreia Viral Bovina conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.

<i>Variáveis</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de animais Sororreagentes</i>	<i>Prevalência (%)</i>	
Número de animais da propriedade	≤ 50	83	17	20,48 ^a
	51 a 100	459	115	25,05 ^b
	>100	172	124	72,09 ^c
Área da propriedade (hectares)	≤25	287	90	31,36 ^a
	26 a 50	323	77	23,62 ^b
	>50	104	89	63,57 ^c
Percentual de entrada de animais	≤5%	360	99	25,00% ^a
	6% a 10%	158	47	29,75% ^b
	>10%	196	110	56,12 ^c
Percentual de saída de animais	≤5%	63	5	7,93 ^a
	6% a 10%	74	19	25,67 ^b
	>10%	577	232	40,20 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.6.5 Modelo de regressão logística para o BVDV

Foi possível verificar que o modelo ajustado foi considerado significativo ($r^2=0,532$; AIC = 617,362; $p < 0,0001$), sendo que as variáveis analisadas foram: região, sistema produção, número de animais, área da propriedade, idade dos animais estudados, percentual de entrada e saída de animais, reutilização de luva de palpação e compartilhamento de pasto com vizinhos (Tabela 17).

A partir deste modelo verificou-se que a região Sudoeste apresenta 52 vezes mais chances de possuir bovinos infectados pelo Vírus da Diarreia Bovina a Vírus do que as outras regiões envolvidas no estudo (OR=52,388; IC95% 4,629 – 5892,873). O sistema de produção semi-intensivo apresentou 1,33 mais chances de possuir animais infectados quando comparado ao sistema de produção intensivo (OR=1,333; IC95% 0,261 – 6,815). Sobre o número de animais, os pertencentes a propriedades com total igual ou menor que 50 bovinos apresentam 16,682 vezes mais chances de serem soropositivos para o BVDV, quando comparado aos bovinos de propriedades com total superior a 100 animais (OR=16,682; IC95% 3,218 – 86,481).

Propriedades com área igual ou menor que a 25 hectares e entre 26 e 50 hectares apresentaram um caráter protetor, apresentando OR igual a 0,007 e 0,009, respectivamente. Com relação a idade dos animais, verificou-se que os bovinos com idade superior a 48 meses apresentaram 4,407 vezes mais risco de estarem infectados com o vírus BVDV do que os animais mais jovens (OR=4,407; IC95% 2,456 – 7,906). Quanto ao percentual de entrada de animais nas propriedades, verificou-se que em rebanhos onde o percentual era superior a 10%, os bovinos apresentaram 17,56 vezes mais risco de exposição ao vírus (OR=17,56; IC95% 7,613 – 40,506). Já para o percentual de saída de bovinos das propriedades, verificou-se que em rebanhos com percentual de saída de 6% a 10% de animais o risco de exposição dos animais ao BVDV era 5,266 vezes maior (OR=5,266; IC95% 1,131 – 24,507).

Sobre a reutilização da luva de palpação, as propriedades onde esse manejo não era empregado apresentavam um fator de proteção de OR=0,107 (IC95% 0,034 – 0,334).

Por fim, com relação ao compartilhamento de pastos com os vizinhos, os animais de propriedades que mantinham esse tipo de manejo apresentaram 9,148 vezes mais risco de estarem infectados com o BVDV.

TABELA 17 - Coeficientes (valor) e Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o BVDV

Variáveis	Valor	Erro Padrão	Pr > Qui²	OR (IC95%)	
Intercepto	0,333	0,379	0,379		
Regiões do Estado do Paraná	Centro Oriental	0,000	0,000		
	Oeste	-1,140	0,691	0,099	0,320 (0,083 - 1,240)
	Demais Regiões	-1,979	0,437	< 0,0001	0,138 (0,059 - 0,325)
	Sudoeste	3,959	1,238	0,001	52,388(4,629 - 592,873)
Sistema de produção	Intensivo	0,000	0,000		
	Semi-intensivo	0,288	0,832	0,730	1,333 (0,261 - 6,815)
	Extensivo	-5,809	1,523	0,000	0,003 (0,000 - 0,059)
Número de animais da propriedade	>100	0,000	0,000		
	51 a 100	2,069	0,763	0,007	7,915 (1,776 - 35,280)
	≤ 50	2,814	0,840	0,001	16,682 (3,218 -86,481)
Área da propriedade (hectares)	>50	0,000	0,000		
	≤25	-4,947	0,981	< 0,0001	0,007 (0,001 – 0,049)
	26 a 50	-4,745	0,661	< 0,0001	0,009 (0,002 – 0,032)
Idade (meses)	7 a ≤24	0,000	0,000		
	25 a 48	1,145	0,319	0,000	3,144 (1,684 - 5,869)
	>48	1,483	0,298	< 0,0001	4,407 (2,456 – 7,906)
Percentual de entrada de animais	6% a 10%	0,000	0,000		
	>10%	2,866	0,426	< 0,0001	17,560 (7,613 - 40,506)
	≤5%	0,064	0,618	0,917	1,066 (0,317 – 3,583)
Percentual de saída de animais	>10%	0,000	0,000		
	6% a 10%	1,661	0,785	0,034	5,266 (1,131 – 24,507)
	≤5%	-1,783	0,865	0,039	0,168 (3,751 – 22,310)
Reutilização luva de palpação	Sim	0,000	0,000		
	Não	-2,237	0,583	0,000	0,107 (0,034 – 0,334)
Compartilhamento de pasto com vizinhos	Não	0,000	0,000		
	Sim	2,214	0,455	< 0,0001	9,148 (3,751 – 22,310)

Por meio da elaboração da curva ROC, verificou-se que a explicabilidade e aceitação do modelo é de 88,9%, sendo sua especificidade equivalente a 91,27% (percentual de acerto do diagnóstico negativo, ou seja, o verdadeiro negativo), e sua sensibilidade equivalente a 64,45% (percentual de acerto do diagnóstico positivo, ou seja, o verdadeiro positivo) (Figura 5).

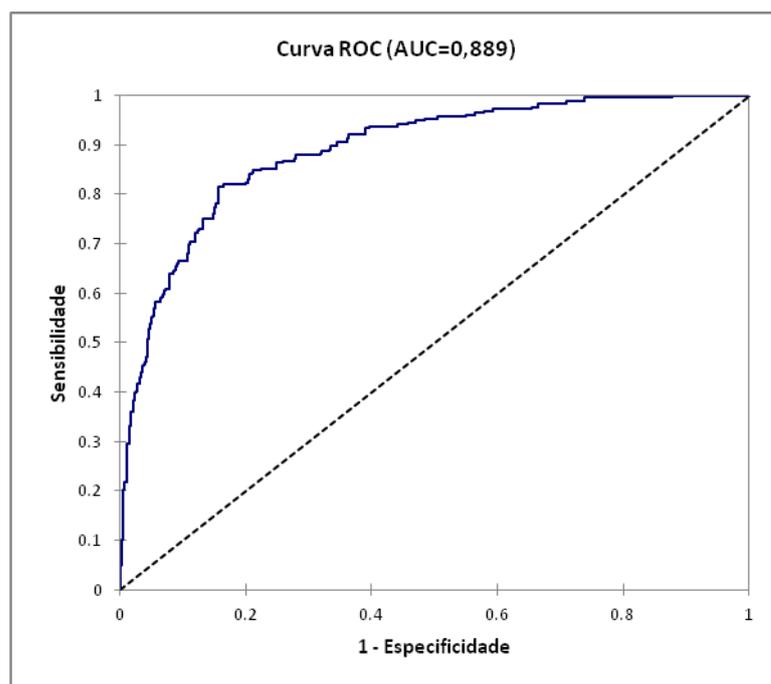


FIGURA 5 - Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Vírus da Diarreia Viral Bovina.

5.7 VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3

5.7.1. Prevalência dos bovinos sororreagentes ao bPIV-3 conforme a idade dos animais

Observou-se relação significativa entre os bovinos sororreagentes e a idade dos animais estudados, pois quanto mais velhos os animais, maior a prevalência de bovinos positivos ao vírus bPIV-3. Animais com idade entre sete a 24 meses apresentaram prevalência de 67,78% (162/239), bovinos de 25 a

48 meses de 82,63% (157/190) e animais com mais de 48 meses de 89,47% (255/285) (Tabela 18).

TABELA 18 - Prevalência dos bovinos sororreagentes ao Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 conforme a faixa etária dos animais.

<i>Faixa etária (meses)</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de soropositivos</i>	<i>Prevalência (%)</i>
7 a 24	239	162	67,78 ^a
25 a 48	190	157	82,63 ^b
>48	285	255	89,47 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.7.2 Prevalências de bovinos sororreagentes ao bPIV-3 conforme o manejo das propriedades

Dentre os fatores estudados, relacionados com manejo da propriedade, o único que apresentou diferença significativa foi o compartilhamento de pasto com vizinhos, sendo que nas propriedades onde os animais eram submetidos a esse manejo, os bovinos apresentaram prevalência de soropositividade de 88,23% (165/187) para o bPIV-3 (Tabela 19).

TABELA 19 - Prevalências de bovinos sororreagentes ao Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 conforme o manejo de compartilhamento de pasto com vizinhos.

<i>Tipo de Manejo</i>		<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de animais Sororreagentes</i>	<i>Prevalência (%)</i>
Compartilhamento de pasto com vizinhos	Sim	187	165	88,23 ^a
	Não	527	409	77,60 ^b

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

5.7.3 Prevalência de bovinos sororreagentes ao bPIV-3 conforme as características das propriedades e a movimentação de animais

Ocorreu diferença significativa entre os resultados da sorologia para o bPIV-3 levando-se em consideração o número total de área da propriedade, a área da propriedade, a lotação e o percentual de saída bovinos das propriedades com a prevalência de bovinos sororreagentes para bPIV-3 (TABELA 20).

Houve aumento da prevalência de bovinos sororreagentes para o bPIV-3 conforme aumentou o número total de animais das propriedades estudadas, com prevalências de 73,49% (61/86), 76,25% (350/459) e 94,76% (163/172), para propriedades com até 50 animais, entre 51 e 100 e com mais de 100 bovinos, respectivamente.

Com relação ao tamanho das áreas das propriedades estudadas, observou-se maior prevalência de bovinos soropositivos (90,36% - 94/104) em propriedades com áreas maiores que 50 hectares.

Ao analisar a lotação de bovinos por hectare percebeu-se que a maior prevalência de bovinos soropositivos ocorreu em propriedades onde a lotação era de 3 animais por hectare (89,53% - 86/77).

Quando o percentual de saída dos animais da propriedade esteve entre 6% a 10%, a prevalência de animais positivos ao teste diagnóstico foi de 89,19% (66/74), sendo esta a mais elevada entre os animais estudados.

TABELA 20 - Prevalência de bovinos sororreagentes ao Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 conforme as características das propriedades e a movimentação de animais.

<i>Variáveis</i>		<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de animais Sororreagentes</i>	<i>Prevalência (%)</i>
Número de animais da propriedade	≤ 50	83	61	73,49 ^a
	51 a 100	459	350	76,25 ^b
	>100	172	163	94,76 ^c
Área da propriedade (hectares)	≤25	287	236	82,23 ^a
	26 a 50	323	244	75,54 ^b
	>50	104	94	90,38 ^c
Lotação de animais por hectare	≤2	300	221	73,22 ^a
	3	86	77	89,53 ^b
	>3	227	180	79,29 ^c
Percentual de saída de animais	≤5%	63	35	55,55 ^a
	6% a 10%	74	66	89,19 ^b
	>10%	577	473	81,97 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.7.4 Modelo de regressão logística para o bPIV-3

Foi possível verificar que o modelo ajustado foi considerado significativo ($r^2=0,278$; AIC = 591,753; $p < 0,0001$), sendo que as variáveis estudadas foram: número de animais, área da propriedade, lotação, idade e percentual de saída de animais (Tabela 21).

A partir deste modelo, verificou-se que as propriedades com número de animais igual ou menor a 50 e entre 51 e 100 apresentaram caráter protetor para a disseminação do vírus, OR igual a 0,137 e 0,384, respectivamente.

Bovinos de propriedades com área menor ou igual a 25 hectares apresentaram 1,419 vezes mais chances de possuir bovinos infectados pelo

Vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3, quando comparados com propriedades de área maior que 50 hectares (OR=1,419; IC95% 0,517 – 3,893).

Sobre a idade dos animais, constatou-se que os bovinos com idade maior que 48 meses apresentaram 5,530 vezes mais chances de estarem infectados, do que os animais mais jovens (OR=5,530; IC95% 3,172 – 9,639).

Quanto à lotação, notou-se que nas propriedades com três bovinos por hectare, os animais apresentaram 8,874 mais chances de estarem infectados, do que em propriedades com lotação menor ou igual a dois bovinos por hectare (OR=8,874; IC95% 2,858– 27,554).

Considerando percentual de saída de animais das propriedades, observou-se que em rebanhos com taxas iguais ou inferiores a 5 % e entre 6% e 10%, apresentaram caráter protetor à disseminação viral, OR igual a 0,070 e 0,117, respectivamente.

TABELA 21 - Coeficientes (valor) e Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3.

<i>Variáveis</i>	<i>Valor</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>Pr > Qui²</i>	<i>OR (IC95%)</i>	
Intercepto	2,525	0,461	< 0,0001		
Número de animais da propriedade	>100	0,000	0,000		
	51 a 100	-0,958	0,407	0,018	0,384 (0,173- 0,851)
	≤ 50	-1,991	0,504	< 0,0001	0,137 (0,051-0,367)
Área da propriedade (hectares)	>50	0,000	0,000		
	≤25	0,350	0,515	0,497	1,419 (0,517 - 3,893)
	26 a 50	-1,360	0,384	0,000	0,257 (0,121 - 0,545)
	7 a 24	0,000	0,000		
Idade (meses)	25 a 48	0,843	0,265	0,001	2,323 (2,858 - 27,554)
	>48	1,710	0,284	< 0,0001	5,530 (3,172 - 9,639)
	≤2	0,000	0,000		
Lotação de animais por hectare	3	2,183	0,578	0,000	8,874 (2,858 – 27,554)
	>3	-0,540	0,339	0,111	0,583 (0,300 – 1,132)
	>10%	0,000	0,000		
Percentual de saída de animais	6% a 10%	-1,107	0,529	0,036	0,331 (0,117 – 0,932)
	≤5%	-2,661	0,460	< 0,0001	0,070 (0,028 – 0,172)

Por meio da elaboração da curva ROC, verificou-se que a explicabilidade e aceitação do modelo é de 79,9%, sendo sua especificidade equivalente a 12,14% (percentual de acerto do diagnóstico negativo, ou seja, o verdadeiro negativo), e sua sensibilidade equivalente a 98,61 % (percentual de acerto do diagnóstico positivo, ou seja, o verdadeiro positivo) (Figura 6).

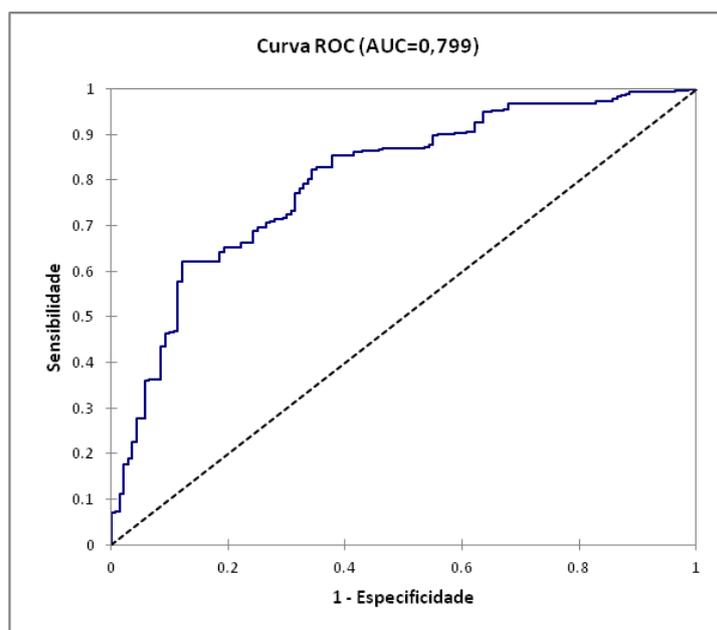


FIGURA 6 - Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3.

5.8 VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO

5.8.1 Prevalência de bovinos sororreagentes ao BRSV conforme os sistemas de produção

Com relação ao sistema de produção, observou-se maior soroprevalência nos animais criados em sistema intensivo (99,01% - 100/101), quando comparado aos bovinos criados nos sistemas extensivo (88,37% - 76/86) e semi-intensivo (93,36% - 492/527) (Tabela 22).

TABELA 22 - Prevalência de bovinos sororreagentes ao Vírus Respiratório Sincicial Bovino conforme os sistemas de produção.

<i>Sistema de Produção</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de soropositivos</i>	<i>Prevalência (%)</i>
Extensivo	86	76	88,37% ^a
Semi-Intensivo	527	492	93,36% ^b
Intensivo	101	100	99,01% ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.8.2 Prevalência de bovinos sororreagentes ao BRSV conforme a característica da propriedade

Houve relação significativa entre a existência de bovinos sororreagentes ao BRSV e o tamanho das áreas das propriedades estudadas. Observou-se que quanto maior a área da propriedade estudada maior a prevalência de animais soropositivos, chegando a uma prevalência de 99,03% de bovinos positivos em propriedades com área superior a 50 hectares. Vale ressaltar que, mesmo em propriedades com área igual ou menor 50 hectares, a prevalência de animais positivos foi maior que 90% (Tabela 23).

TABELA 23 - Prevalência de bovinos sororreagentes ao Vírus Respiratório Sincicial Bovino conforme a área da propriedade em hectares

<i>Área da propriedade (hectares)</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Nº de soropositivos</i>	<i>Prevalência (%)</i>
≤25	287	263	91,63 ^a
26 a 50	323	302	93,49 ^b
>50	104	103	99,03 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui – quadrado ($p < 0,05$)

5.8.3 Modelo de regressão logística para o BRSV

Foi possível verificar que o modelo ajustado foi considerado significativo ($r^2=0,050$; AIC = 335,601; $p < 0,0001$), sendo que a variável utilizada como

modelo foi a região do estado do Paraná onde se encontravam as propriedades estudadas (TABELA 24).

A partir deste modelo verificou-se que a região Oeste apresentou 2,674 vezes mais chances de ter bovinos infectados pelo Vírus Respiratório Sincicial Bovino do que as outras regiões envolvidas no estudo (OR=2,676; IC95% 0,344 – 20,801).

TABELA 24 - Coeficientes (valor) e Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o BRSV

<i>Variáveis</i>	<i>Valor</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>Pr > Qui²</i>	<i>OR (IC95%)</i>	
Intercepto	3,191	0,283	< 0,0001		
Regiões do Estado do Paraná	Centro Oriental	0,000	0,000		
	Oeste	0,984	1,047	0,347	2,674 (0,344 – 20,801)
	Demais Regiões	-0,957	0,364	0,009	0,384 (0,188 – 0,784)
	Sudoeste	-1,078	0,427	0,012	0,340 (0,147 – 0,785)

Por meio da elaboração da curva ROC, verificou-se que a explicabilidade e aceitação do modelo é de 62,9%, sendo sua especificidade equivalente a 0,00% (percentual de acerto do diagnóstico negativo, ou seja, o verdadeiro negativo), e sua sensibilidade equivalente a 100,00% (percentual de acerto do diagnóstico positivo, ou seja, o verdadeiro positivo) (Figura 7).

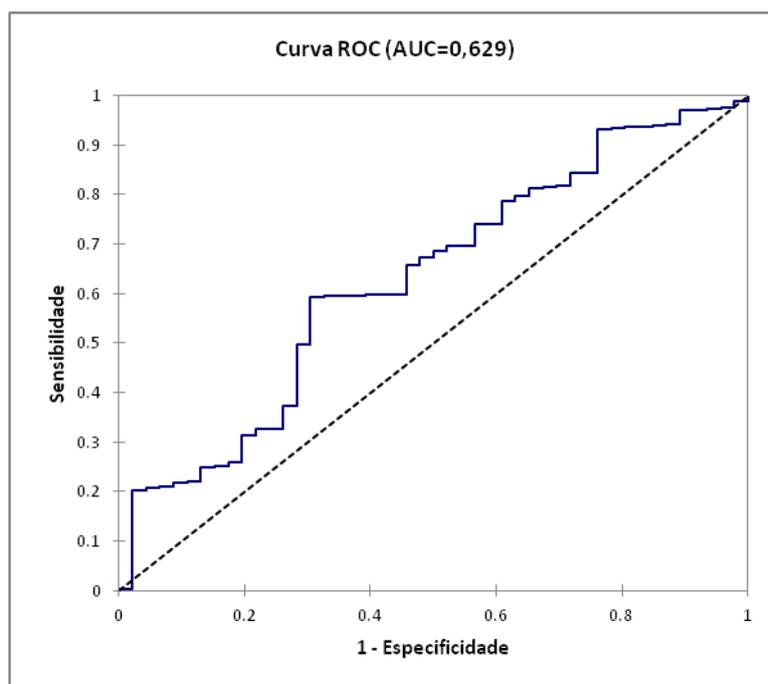


FIGURA 7 - Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o Vírus Respiratório Sincicial Bovino.

6 DISCUSSÃO

6.1 PREVALÊNCIA DOS AGENTES VIRAIS RESPIRATÓRIOS ESTUDADOS

Os vírus BoHV-1, BVDV, bPIV-3 e BRSV estão presentes nos rebanhos de bovinos de corte e de leite de todo o mundo, inclusive no Brasil (FLORES et al., 2005; SOLIS-CALDERON et al., 2007, SPILKI; ARNS, 2008; OIE, 2013). Esses vírus, juntamente com microrganismos bacterianos, são agentes etiológicos do Complexo de Doenças Respiratórias dos Bovinos e causam perdas econômicas à bovinocultura mundial (RADOSTITS et al., 2007). O presente estudo confirmou a existência desses vírus em propriedades que criam animais da raça HPB no estado do Paraná.

Conforme a literatura é comum em levantamentos sorológicos de vírus respiratórios observar-se a detecção de um único vírus nos animais estudados. (BRITO et al., 2004; SOLIS-CALDERON et al., 2007; GATTI et al., 2010; ALEXANDRINO et al., 2011; FINO et al., 2012). Porém os trabalhos que relatam a ocorrência de coinfeções são relativamente escassos (AFFONSO et al., 2011; ALEXANDRINO et al., 2011). O presente estudo demonstrou pela primeira vez a ocorrência dos quatro agentes virais ligados ao Complexo de Doenças Respiratórias dos Bovinos de forma associada no estado do Paraná e no Brasil.

Com relação ao BoHV-1, a prevalência de animais soropositivos encontrada neste trabalho foi menor que as observadas por Barros Filho et al. (1997) (27,1%), Biogenesis-Bagó (2008) (46%), Médici et al. (2000b) e Dias et al. (2012) (59,0%) também no estado do Paraná, que Holz et al. (2009) (29,2%) e Krahl et al. (1997) (29,3%) no estado do Grande do Sul, que Santos et al. (2014) (66,75%) no Espírito Santo e que Freitas et al. (2014) no Maranhão (62,23%). Assim como a prevalência de 64,3% verificada por Richtzeinhain et al. (1999a) em 21 estados brasileiros.

A diversidade dos resultados encontrados no Brasil pode estar ligada a fatores regionais, tipo de manejo utilizado, delineamento amostral dos estudos,

técnicas diagnósticas utilizadas, assim como o não conhecimento se os bovinos foram ou não vacinados contra o vírus em questão. A baixa prevalência encontrada nesse trabalho pode estar relacionada com a existência de assistência técnica, fato esse não avaliado no presente trabalho, porém observado nas anotações adicionais dos questionários das propriedades que possuíam menos que 10% dos animais sororreagentes, considerando assim a existência da assistência técnica como possível fator protetor. Segundo Sousa et al. (2008) a ausência de assistência técnica foi considerada como fator de risco para infecção de BoHV-1 na Paraíba.

O vírus BVDV foi diagnosticado nos animais leiteiros de raça HPB do Estado do Paraná, porém sua ocorrência é menor que a anteriormente observada, que variou de 50 a 73,5 % (RICHTZEINHAIN, 1997; MÉDICI et al., 2000a; FLORES et al., 2005; BIOGENISIS-BAGÓ, 2008). A ocorrência do BVDV no presente estudo também foi menor que os 66,3% encontrados por Quincozes et al. (2007) e os 57,7% de Frandoloso et al. (2008), ambos no estado do Rio Grande do Sul e aos 52,5% encontrados por Oliveira et al. (2012) em São Paulo e Minas Gerais.

Dentre as justificativas para menor prevalência do vírus nos rebanhos estudados no presente trabalho pode-se dizer que não foram utilizadas amostras provenientes de rebanhos com sinais aparentes de doenças respiratórias ou reprodutivas ou ainda vacinadas contra o vírus pesquisado assim como a menor prevalência encontrada no estudo pode também ser devido ao fato da estirpe viral (BVDV-1 NADL) utilizada para diagnóstico ocorrer com menor prevalência no estado do Paraná.

Por outro lado, a prevalência para o vírus BVDV, observada neste trabalho foram semelhantes aos 34,0% de Biogenesis-Bagó (2008) em Santa Catarina, aos 35,2% de Brito et al. (2002) em Goiás, aos 39,5% de Langoni et al. (1995) em São Paulo e aos 39,3% de Flores et al. (2005) no Rio Grande do Sul. Já trabalhos realizados na região Nordeste nos estados da Bahia (14,6%), Paraíba (22,2%) e Maranhão (27,6%) apresentaram resultados menores aos encontrados neste estudo (RIBEIRO et al., 1987; THOMPSON et al., 2006; SOUSA et al., 2008). O manejo das propriedades, o nível de tecnificação das

mesmas, assim como o clima regional podem justificar as diferentes prevalências encontradas na literatura.

A prevalência do vírus bPIV-3 observada nas amostras deste trabalho foi próxima aos resultados de 84,1% obtidos no estado de São Paulo (CANDEIAS; RIBEIRO, 1970) e dos 82% obtidos na espécie ovina na microrregião de Botucatu-SP (GONÇALVES et al., 2011). Por outro lado, foi maior que os 36,7% a 70,0% e os 34% obtidos encontrados para espécie bovina e ovina, respectivamente, no estado de São Paulo e maior que os 68,5% observado em bovinos no estado da Bahia (SARDI et al., 2002; DAL PIZZOL et al., 1968; CANDEIAS; RIBEIRO, 1968). Por fim, a prevalência do bPIV-3 encontrada neste estudo foi menor que a prevalência de 97% obtida por Wizgmann et al. (1972) ao pesquisar 221 amostras de soro bovino no estado do Rio Grande do Sul.

Segundo Gonçalves et al. (2003) a infecção por bPIV-3 na maioria das vezes passa despercebida pelos proprietários e até mesmo pelo médico veterinário que presta assistência técnica à propriedade, o que provavelmente vem ocorrendo no estado do Paraná, uma vez que é alta a prevalência do vírus em rebanhos leiteiros da raça HPB.

A prevalência do BRSV de 93,5% foi a maior entre todos os vírus estudados no trabalho. Ao comparar o resultado outros estudos brasileiros observou-se que foram maiores que nos estados do Rio Grande do Sul (17,3 a 79%), São Paulo (74% a 79,5%), Minas Gerais (73%), Rio de Janeiro (71%), Mato Grosso Sul (57%) e até mesmo no Paraná (80%) (BARNIER, 1996; DRIEMEIER et al. 1997; AFFONSO, 2013). A permanência do BRSV, assim como sua alta prevalência nos rebanhos, está associada com a infecção e reinfecção subclínica de um pequeno grupo de animais dentro dos rebanhos (AFFONSO, 2013; KLEM et al., 2013). Segundo Domingues et al. (2011), é comum a existência do BRSV em bovinos adultos sem sinais clínicos sugestivos de doença respiratória.

A movimentação de animais entre as propriedades sem o controle dos agentes virais respiratórios é importante fator para disseminação destes microorganismos. Não há legislação tanto no estado do Paraná quanto no Brasil, que regularizem o controle de trânsito de animais para os vírus

estudados, uma vez que a Resolução do Estado do Paraná nº5 de 4 de fevereiro de 2011, que determina as normas da emissão de guia de trânsito animal (GTA), impõe restrições para o trânsito de bovinos somente para propriedades que não possuem vacinação para Brucelose e Febre Aftosa as consideradas focos de Brucelose e Tuberculose, assim como suspeitas e/ou foco para doenças vesiculares. Este fato ocorre em todo território brasileiro, pois a resolução acima foi embasada nas normas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pela defesa sanitária animal do Brasil.

6.2 PREVALÊNCIA DE CASOS ISOLADOS E DE COINFECÇÕES DOS AGENTES VIRAIS ESTUDADOS

Ao analisar os casos de coinfeção, os resultados do presente estudo revelaram a importância da associação dos vírus bPIV-3 e BRSV. Ambos os vírus apresentaram as maiores prevalências neste estudo. A forma similar de transmissão e manutenção dentro das propriedades, juntamente com a manifestação clínica discreta e a reinfeção dos animais adultos podem ter contribuído para alta prevalência dessa associação nos rebanhos bovinos do Estado do Paraná (GONÇALVES et al., 2003; KLEM et al., 2013).

Nas amostras reagentes analisadas neste trabalho, as associações entre BoHV-1 e BVDV e de BoHV-1 e bPIV-3 não foram encontradas, de forma semelhante aos dados de Yousef et al. (2013) em estudo realizado na Arábia Saudita. Diferentemente, Alexandrino et al. (2011) verificaram 25,5% de associação entre BoHV-1 e BVDV.

Na análise da detecção múltipla dos três vírus observou-se maior prevalência para a associação dos seguintes: BVDV, bPIV-3 e BRSV, sendo esta maior que a prevalência de 11,30% obtida por Yousef et al. (2013). Uma explicação para este fato é que o BVDV pode causar imunossupressão nos animais infectados pela diminuição da resposta de memória dos linfócitos a outros patógenos, facilitando assim, a infecção múltipla de outros agentes no sistema respiratório dos animais (LAMONTAGE et al., 1989).

Das amostras analisadas no presente estudo, 13,4% (96/714) foram reagentes para os quatro vírus estudados, percentagem superior aos 5% obtidos por Yousef et al. (2013) e inferior aos 49,6% obtidos por Duman et al. (2009). Porém esses autores pesquisaram animais que apresentavam sinais clínicos de doença respiratória, o que pode ter contribuído para a elevada prevalência de animais positivos e a presença das respectivas associações.

6.3 PREVALÊNCIA DOS VÍRUS ESTUDADOS NAS PROPRIEDADES

A prevalência para BoHV-1 observada neste estudo foi próxima dos 71,5% observados por Dias et al. (2012) no Paraná, cujas amostras eram de rebanhos não vacinados. Porém o resultado foi menor que os 81,3% descritos por Alexandrino et al. (2011) em rebanhos leiteiros no estado de Minas Gerais e São Paulo, e que os 100% obtidos por Bezerra et al. (2012) e Freitas et al. (2014) no Maranhão. Por outro lado, foram maiores que 26% obtidos por Kruger et al. (1993) em bovinos de leite da região metropolitana de Curitiba, e que os 57,7% observados por Frandoloso et al. (2008) no Rio Grande do Sul. Segundo Del Fava et al. (2002) a diversidade de resultados encontrados na literatura está relacionada com técnicas diferentes de diagnóstico e amostragem, características regionais e aplicação de programas de controle.

A prevalência do BVDV nas propriedades estudadas foi semelhante aos 88,3% no estado de Goiás (BRITO et al., 2010), onde se examinaram amostras de animais não vacinados. Também foi próximo aos 80,7% observados na Jordânia (TALAFHA et al., 2009). Maiores prevalências de rebanho foram observadas no estado de Goiás 100% (GUIMARÃES et al., 2000); Maranhão 91,66% a 100% (CHAVES et al., 2009; SOUSA et al., 2009). Prevalências menores foram encontradas no estado de Goiás 70,3% (BRITO et al., 2004); Rio Grande do Sul 57,7% (FRANDOLOSO et al., 2008) e os 60% e 47,1% em rebanhos da México e Bélgica, respectivamente (SOLIS-CALDERON et al., 2005; SARRAZIN et al., 2013).

No Brasil, os trabalhos sobre a prevalência do bPIV-3 são escassos, o que dificulta a comparação dos resultados. Como exemplo pode-se citar o trabalho realizado por Gonçalves et al. (2011) na espécie ovina, onde o vírus foi encontrado nas cinco fazendas de bovinos estudadas que apresentavam histórico de doenças respiratórias em seus animais nos últimos cinco anos. Na Bahia, o bPIV-3 foi encontrado nas seis fazendas incluídas no estudo (SARDI et al., 2002). Em países do Oriente Médio (Arábia Saudita, Irã e Síria) e África (Nigéria) também relataram a presença do agente (GIANGASPERO et al., 1992; IBU et al., 2005; SAKHAEE et al., 2009; YOUSEF et al., 2013). Pardon et al. (2011), na Bélgica, observaram que o bPIV-3 está presente em 53,3% (8/15) dos rebanhos sem histórico de vacinação, dos quais 10% dos bezerros apresentaram sinais clínicos de doenças respiratórias. Na América do Sul, Hurtado et al. (2010) realizaram levantamento sorológico onde foram coletadas amostras de bovinos em 26 fazendas do município de Montéria na Colômbia. Em todas as regiões dessa localidade havia animais sororreagentes para o bPIV-3.

A alta prevalência do bPIV-3 nas propriedades estudadas sugere que possivelmente as infecções por esse vírus não estão sendo diagnosticadas (GONÇALVES et al., 2003), não sendo computadas como problema dos rebanhos leiteiros paranaenses.

Para o BRSV, todas as propriedades estudadas apresentavam animais positivos ao teste diagnóstico empregado, o que não difere de estudos realizados no mundo. Affonso et al. (2011) detectaram a prevalência de BRSV de 45,61%, 84,42%, 54,09% em três rebanhos leiteiros de São Paulo com classificação de alta, média e baixa infecção para BoHV-1, respectivamente, e identificaram dois fatores de risco para infecção do BRSV: o tamanho do rebanho e as condições climáticas.

No Equador, a prevalência nos rebanhos de bovinos leiteiros e mistos não vacinados foi de 91,3% (SAA et al., 2012). Na Argentina, a prevalência de rebanhos positivos para o referido vírus foi de 95,8% (CARNONERO et al., 2011). Em estudo realizado no Irã em rebanhos leiteiros, o vírus foi encontrado nas 15 propriedades pesquisadas (SAKHAEE et al., 2009). No México, Solis-Calderon et al. (2007) encontraram pelo menos três animais positivos em 100%

dos rebanhos de bovinos de corte não vacinados. Pardon et al. (2011), na Bélgica, observaram prevalência relativamente menor (40,0%) mesmo em rebanhos com bovinos com sinais clínicos respiratórios, os quais foram atribuídos às infecções bacterianas e aos outros vírus, que acometem o sistema respiratório de bovinos, como o BVDV.

O BRSV está disseminado nos rebanhos da raça HPB do Paraná, sendo um dos principais agentes virais responsáveis por doenças respiratórias.

6.4 PREVALÊNCIA DOS VÍRUS ESTUDADOS NAS REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ

Em todas as regiões do estado do Paraná os quatro vírus estão presentes. As regiões Oeste e Centro Oriental se destacaram como as regiões de maior prevalência para os vírus estudados. Este fato pode ser atribuído ao tipo de manejo, predominantemente intensivo e semi-intensivo. Sabe-se que nesses tipos de sistemas de criação ocorre maior densidade populacional e conseqüentemente maior contato direto dos animais possibilitado a disseminação dos vírus com maior facilidade (REBHUN, 2000).

A utilização da técnica de inseminação artificial associada a reutilização de luva de palpação, na maioria dos rebanhos estudados nessas regiões, são práticas que facilitam a transmissão viral, uma vez que BVDV e BoHV-1 permanecem viáveis após algumas horas fora do organismo dos animais, ou no próprio sêmen (FLORES, 2007).

Dias et al. (2012) relataram a existência de BoHV-1 em todo o estado do Paraná, em rebanhos bovinos de leite, corte e misto. Porém, estes autores descreveram prevalências regionais para bovinos, diferentes do presente trabalho, sendo estas de 54,9% para a região Sudoeste, de 49,9% para a região Oeste e de 45,9% para a região Centro Oriental.

Para os outros três vírus estudados não foi encontrada na literatura prevalência de distribuição no estado do Paraná, apenas dados pontuais, supracitados no item 6.1.

6.5 HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1

Idade dos bovinos

Alguns fatores de riscos demonstraram diferença significativa na análise univariada para o BoHV-1. Com relação à idade, a prevalência do BoHV-1 foi maior entre os animais com mais de 48 meses. Essa ocorrência elevada está possivelmente relacionada com a maior probabilidade destes animais entrarem em contato com o agente viral durante o tempo de vida (FREITAS et al., 2014; ROMERO-SALAS et al., 2013; BEZERRA et al., 2012; CARBONERO et al., 2011; SOUSA et al., 2009). Outra explicação para o aumento da prevalência de BoHV-1 em animais mais velhos, está relacionada com o início da vida reprodutiva (BARBOSA et al., 2005). Levando em consideração que os animais adultos são ordenhados todos os dias na fase de lactação, a aglomeração destes na sala de espera e ordenha possibilita o maior contato entre eles e secreções contaminadas, favorecendo a disseminação viral entre os animais.

Características de manejo

Segundo Flores (2007) a luva de palpação pode promover a transmissão do BoHV-1, assim como o sêmen contaminado. Narumoto (2013) realizou levantamento de dados obtidos das análises realizadas no Laboratório de Virose Bovinas do Instituto Biológico do Estado de São Paulo, em sêmen de centrais de coletas brasileiras das regiões Norte, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil e evidenciou a contaminação do sêmen com o BoHV-1 por meio de isolamento em cultivo celular, PCR e VN. Dessa forma, erros de manejo e aplicação de técnicas e tecnologias da reprodução podem ter favorecido a elevada prevalência de bovinos sororreagentes em propriedades que utilizavam o manejo de reutilização de luva de palpação, monta natural ou indeminçãoartificial sem controle do semên.

Outro fato a se considerar é o compartilhamento de pasto com vizinhos. Este tipo de manejo possibilitou o contato com animais contaminados, aumentando assim a chance de ocorrer infecção pelo BoHV-1 nos rebanhos estudados, corroborando com os resultados de Dias et al. (2008) e Dias et al. (2012), obtidos em rebanhos do Paraná.

Características da propriedade e movimentação de animais

Rebanhos com maior número de animais em propriedades com áreas menores ou iguais a 25 hectares geram maior lotação e, conseqüentemente, maior contato direto entre os bovinos, aumentando as chances de disseminação do vírus dentro das propriedades, uma vez que a disseminação ocorre principalmente pelo contato direto entre os animais (LEMAIRE et al., 1994) ou por aerossóis em curtas distâncias (MARS et al., 1999; MUYLKENS et al., 2007).

No presente estudo a taxa de entrada de animais superior a 10% apresentou-se como fator de risco, tendo em vista que após a introdução de um animal positivo na propriedade, este atuaria como potencial disseminador do vírus no rebanho (FRANDOLOSO et al., 2008). Maior taxa de entrada animais está diretamente associada ao maior risco de bovinos se infectarem com o BoHV-1.

Análise multivariada de regressão logística para BoHV-1

A análise dos fatores de risco de forma multivariada de regressão logística, onde um fator de risco pode influenciar o outro, mostrou que algumas variáveis tinham efeito protetor quanto à disseminação viral.

O fato do número de animais em uma propriedade ser de 51 a 100 ter sido considerado um fator protetor (OR=0,243) neste estudo pode ser atribuído ao seguinte contexto: em 42,9% (6/14) dos rebanhos há lotação inferior ou igual a dois animais por hectare, gerando assim menor contato entre os

animais e conseqüentemente menor disseminação nas propriedades com essa característica.

As propriedades com lotação de três bovinos por hectare foram propriedades que, na sua maioria, não apresentavam como forma de manejo o compartilhamento de pasto e a monta natural, e obtiveram prevalências menores para o vírus BVDV causador de imunossupressão (16,0 a 33,3%) (LAMONTAGE et al., 1989). É sabido que, quando o BoHV-1 permanece em fase de latência após infecção primária, momento em que a disseminação viral não ocorre (JONES, 2003), a quebra da latência é gerada pela imunossupressão do indivíduo infectado pelo BoHV-1, levando assim a uma reinfecção e conseqüente disseminação viral nos rebanhos (FLORES, 2007). Considerando que em propriedades onde há coinfeção de BoHV-1 e BVDV, as baixas prevalências do BoHV-1 podem ter sido influenciadas também pela menor prevalência de BVDV.

Quanto ao fato da não reutilização da luva de palpação, pode-se dizer que ao fazer a troca da luva a cada animal palpado quebra-se a via de transmissão, fazendo com que esse manejo atue como um fator de proteção.

Com relação a animais com mais de 48 meses e o percentual de entrada de bovinos na propriedade maior que 10%, propriedades que apresentaram esses fatores de riscos tinham, respectivamente, 15 e 52 mais chances dos animais serem soropositivos ao BoHV-1 do que propriedades que não apresentavam esse perfil. Este fato salienta a importância dos animais adultos na transmissão do BoHV-1 dentro das propriedades estudadas. Além disso, há necessidade de impor regras de controle e prevenção da disseminação do vírus no que se refere ao trânsito de bovinos no estado do Paraná, visto que a introdução de apenas um animal contaminado no rebanho é suficiente para que ocorra a disseminação do BoHV-1.

As propriedades com áreas de 26 a 50 hectares têm 11 vezes mais chances de possuir bovinos infectados. Isso pode ser justificado pelo perfil das amostras, pois a grande maioria dos animais avaliados era oriunda de propriedades com essa área, com maior densidade populacional e técnicas de produção mais sofisticada, provocando maior contato entre os animais.

6.6 VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

Os resultados obtidos pela análise univariada e descritiva do BVDV revelaram diferenças significativas dos resultados compilados nas Tabelas 13 a 16.

Sistema de produção

As propriedades com sistema intensivo apresentaram maior prevalência para BVDV, concordando com os resultados de Brito et al. (2010) no estado de Goiás. Pacheco (2010) relatou que o sistema de produção foi considerado como um fator de risco para BVDV em rebanhos de Portugal. Segundo Flores (2003) a transmissão viral ocorre por contato direto ou indireto. No sistema intensivo, o contato direto entre os animais ocorre com mais frequência possibilitando assim, maior chance de transmissão viral.

Os resultados deste estudo discordam dos relatos de Quincozes et al. (2007) no Rio Grande do Sul e Samara et al. (2004) em Minas Gerais. Estes autores demonstraram que rebanhos criados de forma extensiva apresentaram maior número de bovinos sororreagentes, e atribuíram este fato à falta controle sanitário levando assim à disseminação do vírus e, à baixa tecnificação das propriedades estudadas.

Idade dos animais

As maiores prevalências de bovinos sororreagentes no presente estudo ocorreram em animais com idade maior que 24 meses e menor ou igual a 48 meses. De acordo com Mainar- Jaime et al. (2001) o aumento da prevalência de animais sororreagentes está diretamente relacionado com o aumento da idade dos animais. Brito et al. (2010) relacionou a idade com a soropositividade

entre os animais estudados. Estes autores salientaram que animais adultos apresentam maior prevalência por terem maior período de contato com agente.

Os resultados deste levantamento epidemiológico corroboraram os de Castro et al. (1993) em Pernambuco, os quais observaram maiores prevalências em vacas maiores que 24 meses. Sousa et al. (2009) e Chaves et al. (2009), ao realizarem estudos em rebanhos leiteiros não vacinados do Maranhão, obtiveram a frequência de 39,74% e 41,94% de bovinos positivos, nas faixas etárias de três e sete anos, respectivamente. Segundo estes autores a maior frequência nessa faixa etária foi relacionada ao fato dos animais estarem no pico de suas atividades produtivas e reprodutivas.

Quincozes et al. (2007) no Rio Grande do Sul, assim com Alexandrino et al. (2011) em Minas Gerais e São Paulo, Solis-Calderon et al. (2005), no México, e Talafha et al. (2009) na Jordânia, não observaram diferença significativa entre as faixas etárias dos bovinos sororreagentes avaliados em seus estudos.

Características de manejo

Almeida et al. (2013), em rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, consideraram a inseminação artificial como fator de risco para a disseminação do BVDV e associaram o resultado com o manejo de reutilizar luvas de palpação, uma vez que há possibilidade do agente manter-se viável neste material. Houe (1995), por sua vez, destacou a possibilidade da transmissão do BVDV via inseminação artificial. O presente trabalho obteve diferença significativa com relação a análise dessa variável, sendo que nas propriedades que utilizaram esse tipo de manejo apresentaram maior prevalência de bovinos soropositivos.

Este trabalho corroborou a hipótese discutida por Almeida et al. (2013), que apontaram que a prática de reutilização da luva de palpação retal poderia estar envolvida na disseminação do BVDV, pois as propriedades que faziam uso desse tipo de manejo apresentaram maior proporção de animais positivos ao vírus.

O compartilhamento de pasto com os vizinhos foi considerado um potencial fator de risco neste estudo. Esse tipo de manejo possibilitou que os bovinos tenham contato com outros animais, incluindo bovinos positivos para BVDV. Outros trabalhos consideraram o compartilhamento de pasto com diferentes rebanhos como um fator de risco para disseminação BVDV (LUZZAGO et al., 2008; TALAFHA et al., 2009). Talafha et al. (2009) apontaram também a falta de quarentena na introdução de animais nas propriedades, assim como a visita dos funcionários de outras propriedades como fatores de risco para disseminação do BVDV nos rebanhos analisados.

Características das propriedades e movimentação de bovinos

Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com os obtidos por Talafha et al. (2009) na Jordânia e Mainar – Jaime et al. (2001) na Espanha, os quais observaram que a prevalência de animais soropositivos para o BVDV se elevava a medida que aumentava a lotação dos rebanhos avaliados. Esse fato deve estar relacionado com maior densidade populacional dos rebanhos, o que facilitaria a disseminação viral devido ao maior contato entre os animais.

Contudo, em áreas maiores de 50 hectares a prevalência de bovinos soropositivos para o BVDV foi maior, o que não era esperado, uma vez que, em áreas maiores, acredita-se que o contato entre os animais seja menor. Porém, a alta prevalência pode ser justificada pelo grau elevado de tecnificação das propriedades analisadas que possuíam essa característica de sistema de criação intensivo e emprego de inseminação artificial (com reutilização de luvas de palpação), manejos que podem ter contribuído para a disseminação viral. Resultado semelhante ao do presente estudo foi obtido por Solis-Calderon et al. (2005), no qual maiores prevalências ocorreram em propriedades com área entre 101 e 290 hectares, porém deve-se considerar que o estudo foi realizado em gado de corte e não leiteiro.

Propriedades que apresentaram percentuais de entrada e saída maiores que 10% foram as que obtiveram maior prevalência de bovinos sororreagentes ao BVDV. Não foi encontrado na literatura nenhum outro estudo que avaliou o

percentual de entrada e saída de animais da propriedade como possível fator de risco, porém existem autores que avaliaram a origem dos animais como fator de risco (SOLIS-CALDERON et al., 2005), possibilitando a comparação desses resultados com os obtidos neste estudo, uma vez que, a introdução de um animal positivo na propriedade é suficiente para levar a disseminação do vírus dentro do rebanho. A compra e venda de animais, assim como a ida de animais para exposições pode proporcionar a introdução ou o contato com animais positivos, possibilitando assim a infecção dos animais de propriedades livres da doença. Solis-Calderon et al. (2005) trabalharam com a origem dos animais para reposição dos plantéis de bovinos avaliados e constataram que, quando os animais eram originados de outras propriedades, a prevalência de soropositivos dos rebanhos foi maior, ressaltando a importância do controle da movimentação dos bovinos na disseminação do BVDV.

Análise multivariada do modelo de regressão logística para BVDV

Com relação à idade dos animais, verificou-se que os bovinos com idade superior a 48 meses apresentaram 4,4 vezes mais risco de terem se infectado com o vírus BVDV do que os animais mais novos. Isso pode ser justificado pelo fato de que animais mais velhos permanecem expostos ao vírus por tempo mais prolongado quando comparado aos animais jovens, o que aumenta consideravelmente as chances de se obter animais soropositivos ao teste de virusneutralização. Levando em consideração que animais adultos estão em plena fase de reprodução, manejos como palpação retal e inseminação artificial podem levar a disseminação do vírus nos bovinos desta faixa etária.

Quanto ao percentual de entrada de animais em propriedades com taxas superiores a 10% houve 17,5 mais chances de serem detectados animais soropositivos para o BVDV. Resultado semelhante foi observado por Mainar-Jaime et al. (2001), que relataram que propriedades que adquiriam fêmeas adultas de outras unidades produtivas apresentavam 3,83 mais chances de encontrar animais sororreagentes ao BVDV em seus rebanhos.

Apesar de parecer controverso, um percentual de saída de animais da propriedade 6% a 10 % mostrou ser um fator de risco para a contaminação por BVDV. As propriedades com este percentual apresentaram 5,2 mais chances de disseminação do vírus, quando comparadas a outras propriedades. Isto se deve ao fato de que as propriedades avaliadas neste estudo não eram consideradas “fechadas”, ou seja, aquelas em que não ocorre entrada de outros animais e/ou aquelas em que a reposição do plantel era realizada com animais da própria unidade produtora. Desta forma, a saída de animais das propriedades avaliadas neste estudo, se reflete posteriormente na entrada de outros bovinos, possibilitando a circulação do agente na propriedade.

Tendo em vista a possibilidade de transmissão viral por contato direto ou indireto, neste estudo, bovinos de propriedades onde havia o manejo de compartilhamento de pasto apresentavam 9,1 vezes mais chances de apresentarem-se soropositivos, frente ao teste de diagnóstico utilizado. Resultados semelhantes foram observados por Luzzago et al. (2008), que constataram que este manejo foi considerado como fator de risco em rebanhos na Itália, aumentando em 1,05 vezes as chances de se obter animais soropositivos. Este tipo de manejo foi quase unanimidade nas propriedades da região Sudoeste do Estado do Paraná (4/5), contribuindo para que os bovinos desta região tivessem 52 vezes mais chances de apresentar animais soropositivos. Nas demais regiões do Estado do Paraná analisadas neste trabalho, apenas uma das nove propriedades examinadas realizava o manejo de compartilhamento de pasto entre vizinhos, o que pode ter contribuído para considerar as demais regiões como fator de proteção para a disseminação do BVDV nestas propriedades.

Bovinos criados sob o manejo semi-intensivo apresentaram 1,3 vezes mais chances de serem sororreagentes para BVDV, o que pode ser justificado pelo fato de que nesse tipo de sistema de criação o contato entre os animais é maior (REBHUN, 2000). Quanto ao sistema extensivo, este foi considerado fator de proteção para disseminação viral, contrariando os achados de Quincozes et al. (2007) e Samara et al. (2004).

No sistema extensivo os animais têm menor contato direto, pois permanecem soltos no pasto durante todo o dia. O contato mais próximo dos

animais normalmente só ocorre durante a ordenha, dificultado assim a disseminação viral.

O procedimento de não reutilização de luva de palpação retal foi considerado como fator de proteção para disseminação viral. Uma vez que o BVDV pode permanecer viável por dias ou semanas no meio ambiente e em fômites, como a luva de palpação retal, agulhas, seringas, instrumentos cirúrgicos (FLORES, 2007). A utilização de uma única luva por animal é um procedimento simples, e pode diminuir o risco da contaminação com o vírus BVDV dentro dos rebanhos.

Com relação ao número de animais nas propriedades, pode-se dizer que, em unidades produtoras com número de bovinos menor ou igual a 50 animais, os bovinos têm 16,6 vezes mais chances de serem soropositivos para o BVDV. Isto provavelmente ocorreu, pois nas propriedades com esta característica houve maior movimentação do rebanho (entrada/saída), facilitando assim o contato com animais positivos e a introdução do agente no rebanho. Esses resultados diferem dos obtidos por Talafha et al. (2009), que observaram quanto maior o número de animais no rebanho, maior foi a prevalência de animais sororreagentes, para estes autores a maior densidade proporcionou maior contato entre os animais e disseminação viral.

No presente estudo, área da propriedade menor ou igual a 25 hectares e de até 50 hectares apresentaram-se como fator de proteção na disseminação do vírus da BVDV nos rebanhos. Isso se deve ao fato de que na maioria dessas propriedades (14/21) não adotam o compartilhamento de pasto entre vizinhos como manejo, característica que foi considerada um fator de risco importante por favorecer o aumento do número de animais positivos. Cabe ressaltar também que algumas propriedades pertenciam as demais regiões do Estado do Paraná, área esta que foi considerada também como fator protetor nesse estudo.

6.7 VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3

Idade dos bovinos

Os animais com idade superior a 48 meses apresentaram maior prevalência de soropositivos dentre as amostras estudadas, sendo esses achados semelhantes aos 82,24% obtidos por de Hatami et al. (2013) no Irã e os 88% encontrados por de Solis–Calderon et al. (2007) no México em bovinos de corte na faixa etária de cinco a seis anos. Na Turquia, Yavru et al. (2005) encontraram 48,81% de animais adultos soropositivos para bPIV-3, sendo essa prevalência seis vezes maior que a observada em animais jovens (7,87%). O aumento da prevalência de animais soropositivos com o aumento da idade dos animais ocorreram em ambos trabalhos citados e também no presente trabalho. Este fato está relacionado ao maior tempo exposição dos animais adultos ao agente quando comparados aos animais jovens (SOLIS-CALDERON et al., 2007).

Característica de manejo

Nas propriedades, onde o manejo de compartilhamento de pasto com rebanhos vizinhos era realizado houve maior prevalência de animais soropositivos. Não há relatos de outros estudos que avaliaram a utilização deste tipo de manejo como um fator de risco para infecção pelo bPIV-3. Porém Dias et al. (2012), ao estudarem a infecção pelo BoHV-1 em rebanhos do Paraná, consideraram este manejo um fator de risco. Tendo em vista que a forma de transmissão para ambos os vírus é semelhante (FLORES, 2007); e que o compartilhamento de pasto gera o contato direto e/ou indireto de animais de rebanhos diferentes, o emprego deste manejo contribuiu para a disseminação do bPI-3 nos rebanhos estudados.

Características das propriedades e a movimentação de animais

Nas propriedades onde o número de animais era maior que 100, a prevalência de bovinos soropositivos foi maior, assim como nas propriedades com áreas mais extensas (maiores que 50 hectares). Segundo Arns et al. (2007), animais de propriedades com elevada lotação e ventilação inadequada, principalmente quando esses fatores encontram-se associados aos bovinos leiteiros estabulados, apresentavam maior predisposição à infecção pelo bPIV-3. No presente estudo, propriedades com áreas mais extensas e com os animais estabulados, localizaram-se na região Centro-Oriental, local que apresentou maior prevalência para o vírus entre os bovinos estudados.

Quanto à lotação por hectare, prevalências maiores foram observadas em propriedades com lotação de três animais por hectare. Quanto maior a lotação de animais por hectare maior o contato direto entre os mesmos facilitando assim a disseminação viral. Condições como alta densidade de animais associada à ventilação inapropriada podem possibilitar a transmissão viral por aerossóis e pelo contato direto (RADOSTITS et al., 2007). No estudo realizado por Solis-Calderon et al. (2007) as propriedades com lotação de 0,64 a 1,02 bovinos por hectare, apresentaram 90% de animais soropositivos, dados semelhantes aos do presente trabalho.

Quanto à movimentação de animais nas propriedades estudadas, unidades produtoras com percentuais entre 6% a 10% de saída de bovinos foram as que apresentaram maiores prevalências de animais soropositivos para o bPIV-3, à semelhança do que foi observado para o BVDV. Como as propriedades deste estudo não são fechadas, ou seja, após a saída de animais ocorre a reposição do plantel com animais externos, esse tipo de manejo provavelmente contribuiu para a entrada de animais soropositivos nestas propriedades. Solis-Calderon et al. (2007) encontram resultado semelhante, relatando diferença significativa para a variável origem dos animais do rebanho, sendo que plantéis com animais oriundos de outros rebanhos apresentaram maior número de animais soropositivos para o bPIV-3. Ou seja, a introdução de

animais na propriedade foi considerada um importante fator de risco para disseminação viral nos bovinos estudados.

Análise multivariada do modelo de regressão logística para bPIV-3

Animais com idade acima de 48 meses apresentaram 5,53 vezes mais chances de serem sororreagentes ao bPIV-3 que os animais mais jovens. Esse resultado foi semelhante ao de Yavru et al. (2005) na Turquia, que encontraram seis vezes maior a prevalência em animais adultos quando comparado com animais jovens. A idade foi atribuída como fator de risco para a infecção pelo bPIV-3, pois os animais mais velhos permanecem por mais tempo expostos ao contato com o vírus, uma vez que tem maior tempo de vida que os bovinos mais jovens. Esse fato já foi salientado por autores que estudaram o risco de infecção por outros vírus respiratórios (BoHV-1 e BVDV) em rebanhos bovinos (SOUSA et al., 2009; CHAVES et al., 2009; MAINAR- JAIME et al., 2001; CASTRO et al., 1993). Solis-Calderon et al. (2007) obtiveram diferença significativa entre as faixas etárias estudadas (três a quatro; cinco a seis; sete a oito; nove a doze), porém as chances de observação de animais soropositivos em seu estudo foi menor que a observada no presente trabalho.

Nas propriedades onde a lotação foi de três bovinos por hectare a chance de se obter um animal soropositivo foi de 8,87 vezes. É sabido que elevada lotação é considerada fator predisponente para a infecção por bPIV-3 (ARNS et al., 2007). Um fator que pode ter influenciado nesse resultado foi o fato de que as propriedades pertencentes à esta categoria de lotação também se enquadravam nas unidades produtoras com áreas menores que 25 hectares, as quais obtiveram 1,41 vezes mais chances de apresentarem animais sororreagentes para este vírus.

6.8 VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO

Sistema de Produção

Neste estudo, os bovinos que eram mantidos em sistema intensivo apresentaram maior prevalência para o BRSV do que os criados de forma extensiva. Segundo Rebhun et al. (2000), animais mantidos neste tipo de sistema de criação tem maior contato direto entre si, facilitando a disseminação viral.

Norström et al. (1999), em estudo realizado na Noruega, concluíram que o tipo de produção e tamanho de rebanho foram os fatores de riscos associados com a disseminação do BRSV. O risco de ocorrer doença respiratória aguda relacionada com BRSV se eleva com o aumento do número de animais nos rebanhos, devido ao contato indireto com outros rebanhos através da movimentação de profissionais. Nos rebanhos leiteiros, estudados por estes autores, ocorreu maior movimentação de técnicos de inseminação artificial e médicos veterinários, que podem ser responsáveis pela disseminação viral, assim como os animais tiveram maior contato direto, quando comparados aos rebanhos de corte e mistos.

Característica da Propriedade

Com relação à área da propriedade, unidades produtivas com mais de 50 hectares apresentaram maior prevalência de bovinos positivos para o BRSV. Essas propriedades estavam localizadas na região Centro-Oriental do Estado do Paraná, onde os animais são criados de forma intensiva e semi-intensiva. Isto pode ter influenciado os resultados, contribuindo para a elevada prevalência de bovinos soropositivos observada nestas propriedades. A avaliação da área das propriedades como fator de risco não foi encontrada na literatura, o que impossibilitou a realização de comparações.

Análise multivariada do modelo de regressão logística para BRSV

Dentre as regiões do estado do Paraná estudadas, a Oeste mostrou maior prevalência para o BRSV. A taxa de movimentação dos animais nesta região foi, provavelmente, o fator que influenciou a prevalência. Após a análise de regressão logística, as propriedades localizadas na região Oeste do estado do Paraná tiveram 2,67 mais chances de apresentarem animais soropositivos para o BRSV que as propriedades das demais regiões. Dias et al. (2012), ao determinar a prevalência do BoHV-1 no estado do Paraná, observaram maior prevalência deste vírus nas regiões Norte, Noroeste e Centro Oeste do estado e associaram este resultado com a grande movimentação de bovinos entre os estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul.

Ohlson et al. (2010), em estudo realizado na Suécia em rebanhos leiteiros, observaram que ocorreu diferença significativa entre as frequências de rebanhos soropositivos da região Norte, Sul e Central do país, o que foi atribuído ao maior comércio de bovinos entre rebanhos do Sul e/ou maior densidade de animais nos rebanhos dessa região. O fornecimento de botas para os visitantes foi considerado como fator protetor para disseminação viral no estudo supracitado, o que contribuiu para a biossegurança da propriedade. Rebanhos com 66 a 99 vacas apresentaram maior frequência, quando comparados com rebanhos menores. Este fato foi atribuído a maior frequência de visitantes em rebanhos maiores, podendo introduzir o vírus em questão nas propriedades livres.

Avaliou-se a prevalência de bovinos soropositivos em diferentes distritos do estado de Apure, Venezuela, e não houve diferença das prevalências de animais positivos entre os distritos (OBANDO et al., 1999). De acordo com Saa et al. (2012) e Affonso et al. (2011), outros fatores de riscos podem ser responsáveis pela disseminação do vírus BRSV dentre eles pode-se citar: a altitude, existência fazendas de bovinos ao lado das propriedades estudadas, criação mista de bovinos, porém tais características não foram estudadas no presente trabalho. Estudos futuros que avaliem estes fatores de risco devem

ser realizados para verificar a sua responsabilidade pela disseminação viral do BRSV no estado do Paraná.

6.9 CURVA ROC

Para validar os dados, determinar a explicabilidade e a aceitação dos modelos empregados para todos os vírus estudados utilizou-se a Curva Roc representada nas Figuras 3, 4, 5 e 6. Sendo que o modelo que obteve maior explicabilidade foi o empregado para o vírus BoHV-1 (92%), seguido pelo BVDV (88,9%), bPIV-3 (79,9%) e BRSV (62,9%). Através desta análise foi possível dizer que se aplicarmos o questionário a campo para BoHV-1, em 92 de cada 100 propriedades pode-se verificar acerto dos resultados obtidos neste trabalho. O ideal é que a explicabilidade do modelo chegue o mais próximo de 100%. Sendo assim, os modelos empregados para bPIV-3 e BRSV devem ser aprimorados em estudos futuros para que os resultados de aplicação do questionários cheguem mais próximos ao ideal.

7 CONCLUSÃO

Conforme os resultados demonstrados neste trabalho e com a metodologia utilizada concluiu-se:

1. A prevalência dos quatro vírus estudados variaram de 22,3% para BoHV-1, 35,8% para BVDV, 80,4% para o bPIV-3 e para o BRSV 93,5%, estando ambos disseminados nos animais da raça HPB estudados no Estado do Paraná.
2. A prevalência viral nas propriedades estudadas foram de 65,3% para BoHV-1, 88,5% para BVDV, 96,1% para o bPIV-3 e para 100,0% BRSV.
3. A região Oeste do estado do Paraná apresentou as maiores prevalências dos vírus: BoHV-1 (56,1%) e BRSV (96,0%) enquanto a região Centro Oriental a prevalência maior foi de BVDV (47,4%) e bPIV-3 (82,7%).
4. As maiores prevalência de associações virais foram de bPIV-3 e BRSV com 37,1%; e as BVDV, bPIV-3 e BRSV com 19,5% das amostras estudadas.
5. Cerca de 93,6% das amostras estudadas apresentaram-se reagentes para pelo menos um dos vírus estudados.
6. Fatores de riscos observados para cada vírus foram:
 - BoHV-1: área da propriedade (26 a 50 ha), lotação (maior que três bovinos/ha), idade dos animais (maior que 48 meses), percentual de entrada de animais (maior que 10%);
 - BVDV: região (Sudoeste), sistema de produção (Semi-Intensivo), número de animais (menor ou igual a 50), idade dos animais (maior que 48 meses), percentual de entrada de animais (maior que 10%), percentual de saída de animais (6% a 10%), compartilhamento pasto com vizinhos (sim);
 - bPIV-3: área da propriedade (menor ou igual 25 ha), idade dos animais (maio que 48 meses) , lotação (três bovinos / ha);

- BRSV: região (Oeste do Paraná).

8 REFERÊNCIAS

AFFONSO, I. B. **Caracterização epidemiológica da infecção pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em rebanhos bovinos leiteiros do estado de São Paulo**. 2013. 72 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

AFFONSO, I. B.; GATTI, S. P.; ALEXANDRINO, B.; OLIVEIRA, M. C.; MEDEIROS, A. S. R.; BUZINARO, M. G.; SAMARA. Detecção de anticorpos contra o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em rebanhos leiteiros com diferentes prevalências de herpesvirus tipo 1 (BoHV-1) no estado de São Paulo, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 295-300, 2011.

AGRANONIK, M.; HIRAKATA, V. N. Cálculo do tamanho de amostra: proporções. **Revista HCPA**, v. 31, n. 3, p. 382-388, 2011.

ALEXANDRINO, B.; DIAS, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; AFFONSO, G. T.; PEREIRA, G. T.; SAMARA, S. I. Herpesvirus bovino associado à diarreia viral bovina e à leucose bovina. **Ars Veterinária**, v. 27, n. 3, p. 168-174, 2011.

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

ALMEIDA, L. L.; MIRANDA, I. C. S.; HEIN, H. E.; SANTIAGO NETO, W.; COSTA, E. F.; MARKS, F. S.; RODENBUSCH, C.R.; CANAL, C.W.; CORBELLINI, L. G. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 901-907, 2013.

ALMEIDA, R. S.; DOMINGUES, H. G.; SPILKI, F.R.; LARSEN, L. E.; HAGGLUND, S.; BELAK, S.; ARNS, C. W. Circulation of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Veterinary Record**, v. 158, p. 632-634, 2007.

ANDRADE, M. A.; FERNANDEZ, C. L.; LORA, O. C. A. Investigación de anticuerpos contra Rinotraqueitis Infecciosa de los bovinos en el ganado nativo del Peru. **Revista do Centro Nacional de Patologia Animal**, v. 7, n. 2, p. 51-56, 1967.

ANDREWES, C. H.; BANG, F. B.; BURNET, F. M. A short description of the Myxovirus Group (Influenza and Related Viruses). **Virology**, v. 1, n. 1, p. 176-184, 1955.

ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; MARTINEZ, T. C. N.; FIGUEIREDO, A.; LABORDA, S. S. Prevalência de anticorpo para Herpesvírus Bovino 1 (HVB-1) em Bovinos no Estado da Bahia. **Aquivos da Escola Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 13, n. 1, p. 13-31, 1990.

ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V.; OLIVEIRA, S. A. M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Shedding and transmission of bovine viral diarrhoea virus by persistently infected calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 736-742, 2009.

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

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

ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S. Paramyxovirinae. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. Cap. 26, p. 659-688.

ASSIS-BRASIL, N. D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; HINNAH, F. L.; LADEIRA, S.R.L.; SALLIS, E. S. V.; GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 423-430, 2013.

BAKER, J. C. Human and bovine respiratory syncytial virus - Immunopathological Mechanisms. **Veterinary Quarterly**, v. 13, p. 47-59, 1991.
BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 425-445, 1995.

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

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

BARNIER, J. C. **Isolamento e investigação sorológica do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) no Brasil**. 1996. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

BARROS FILHO, I. R.; KRÜGER, E. R.; SOUZA, J.F.; RICKLI JÚNIOR, W. Incidência de bovinos soropositivos para o vírus da Rinotraqueite no município de Palotina - PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25.,1997, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária,1997. 171p.

BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Fatores de risco associados à infecção pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da região Amazônica maranhense. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 107-111, 2012.

BIOGENISIS-BAGÓ. **Imunologia síndromes e vacinas**. 2. ed. Curitiba: Landegraf Editora Ltda, 2008. 52p.

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

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

BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHAS-SON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Serological study on bovine viral diarrhea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. **Vírus Reviews & Research**, v. 7, n. 1, p. 144, 2002.

BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Prevalência da Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 7, p. 7-19. 2010.

BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; VIEIRA, S.; LINHARES, D. C. Detecção de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina em fêmeas de rebanhos leiteiros não vacinados, com histórico de problemas reprodutivos, no Estado de Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 45-53, 2004.

CANÁRIO, R.; SIMÕES, J.; MONTEIRO, M. H.; MIRA, J. C. Diarreia Viral Bovina: uma afecção multifacetada. **Veterinaria.com.pt**, v. 1, n. 2, p. 6, 2009. Disponível em: < <http://www.veterinaria.com.pt>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

CANDEIAS, J. A. N.; RIBEIRO, L. C. Anticorpos inibidores da hemaglutinação para as cepas SF-4 e HA-1 de Myxovirus parainfluenza 3, em gado bovino do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 37, p. 129-35, 1970.

CANDEIAS, J. A. N.; RIBEIRO, L. C. Anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o vírus parainfluenza 3 (HA-1), em gado bovino. **Revista de Saúde Pública**, v. 2, n. 2, p.180-185, 1968.

CANDEIAS, J. A. N.; SUGAY, W.; RIBEIRO, L. C. Isolamento do Myxovirus parainfluenza 3 em gado bovino do estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, p. 207-212, 1971.

CARBONERO, A.; SAA, L. R.; JARA, D. V.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS, A.; BORGES, C.; PEREA, A. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, p. 84-88, 2011.

CARDOSO, M. V.; SFORSIN, A. J.; SCARCELLI, E.; TEIXEIRA, S. R.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; GENOVEZ, M. E. Importância do diagnóstico diferencial em um surto de pneumonia enzoótica bovina. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 111-113, 2002.

CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H.; ABREU, S. R. O.; MUNIZ, A. M. M.; ALBUQUERQUE, A. P. S. Anticorpos neutralizantes contra pestevírus em soros bovinos do estado de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1327-1331, 1993.

CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H.; ABREU, S. R. O.; MUNIZ, A. M. M.; ALBUQUERQUE, A. P. S. Anticorpos neutralizantes contra pestivirus em soros bovinos do estado do Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1327-1331, 1993.

CASTRO, R. S.; SILVA, F. A. G.; FRUTUOSO, E. M.; NASCIMENTO, S. A. Anticorpos contra pestivírus e herpesvírus em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, p. 77-578, 1994.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1448-1451, 2010.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. 501 Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em bovinos leiteiros não vacinados no Estado do Maranhão. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 495-502, 2012.

CHAVES, P. N.; BEZERRA, D. C.; COSTA, F. B.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência e fatores associados á infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados nas regionais de Bacabal e Pedreiras, estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: s. n., 2009.

CODE OF FEDERAL REGULATION. **Title 9:** Animals and animal products. Washington: Animal and plant health inspection service, USDA, 2013. Chap. 1, Part 113.309. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2013-title9-vol1/pdf/CFR-2013-title9-vol1.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1992. 843 p.

CORREA, W. M.; ZEZZA NETO, L.; BARROS, H. M.; GOTTSCHALK, A. F. Nota clínico-patológica de uma enfermidade des mucosas em São Paulo. **Arquivo Brasileiro do Instituto Biológico**, v. 35, p. 141-151, 1968.

CRISTINA, J.; YUNUS, A. S.; ROCKEMANN, D. D.; SAMAL, S. K. Genetic analysis of the G and P genes in ungulate respiratory syncytial viruses by RNase A mismatch cleavage method. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 185-192, 1998.

DAL PIZZOL, M.; RAVAZZOLO, A. P.; FERNANDES, J. C. T.; MOOJEN, V. Detecção de anticorpos para o vírus parainfluenza-3 em bovinos e ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 17, p. 59-64, 1989.

DANNACHER, G.; PERRIN, M.; MOUSSA, A.; FEDIDA, M. "La Rhinotrachéite Bovine Infectieuse". **Recueil de Medecine Vétérinaire**, v. 161, p. 1069-1074, 1985.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; ANGELINO, J. L. Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual do Brasil. **Revista de Educação Continua CRMV-SP**, v. 5, p. 300-312, 2002.

DEL FAVA, C.; STEFANO, E.; PITUCO, E. M.; BILYNSKYJ, M. C. V.; OKUDA, L. H.; POZZI, C. R.; VERÍSSIMO, C. J.; DEMARCHI, J. J. A. A. Erradicação do herpesvírus bovino - 1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n. 2, p. 65-68, 1998.

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 161-168, 2003.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; FERREIRA-NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; MULLER, E. E. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 39-47, 2012.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C.; FREITAS, J. C.; NETO, J. S. F. E.; MÜLLER, E. E. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p.161-168, 2008.

DOMINGUES, H. G.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W. Detecção molecular e análise filogenética de vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em swabs e tecido pulmonar de bovinos adultos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 961-966, 2011.

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

DORELEIJERS, J. F.; LANGEDIJK, J. P.; HARD, K.; BOELEN, R.; RULLMANN, J. A.; SCHAAPER, W. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Solution structure of the immunodominant region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. **Biochemistry**, v. 35, p. 14684-14688, 1996.

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

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 8-13, 2013.

DUMAN, R.; YAVRU, S.; KALE, M.; AVCI, O. Seroprevalence of viral upper respiratory infections in dairy cattle. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 15, n. 4, p. 539-542, 2009.

ELLIS, J. A. Bovine Parainfluenza-3 Virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 3, p. 575-593, 2010.

FARSHID, M.; SHAHRIAR, E. G.; JANZEN, E.; WEST, K; WOBESER, G. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 863-868, 2002.

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.

FINNEY, D. J. The Spearman-Kärber method. In_____. **Statistical method in biological assay**. 2. ed. London: Charles Griffin & Company, 1964. p. 524-531.

FINO, T. C. M.; MELO, C. B.; RAMOS, A. F.; LEITE, R. C. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 2, p. 122-127, 2012.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFMS, 2007. p. 435-462.

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

FLORES, E. F., GIL, L. H. V.; BOTTON, S. A.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J. L.; KREUTZ, L. C.; PILATI, C.; DRIEMEIER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A. C. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 175-183, 2000.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 125-134, 2005.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. Cap. 17, p. 433-488, 2007.

FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; SPAGNOLO, J.; KUSE, N.; FIORI, C.; SCORTEGAGNA, G. T.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C. Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1102-1106, 2008.

FRASER, C. M. **Manual Merck de veterinária**: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 6. ed. São Paulo: Roca, 1991. 1803 p.

FREITAS, E. J. P.; LOPES, C. E. R.; FILHO, J. M. M.; SÁ, J. S.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequencia de anticorpos contra o herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1301-1310, 2014.

GALARZA, J. M.; PERIOLO, O. H. Rinotraqueítis infecciosa bovina – prevalência en la provincia de Formosa mediante la prueba de inmunofluorescência indirecta. **Gaceta Veterinaria**, v. 45, p. 1296-1300, 1983.

GALVÃO, C. L.; DORIA, J. D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da Rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, v. 6, n. 1, p. 15-25, 1962/1963.

GATTI, S. P.; AFFONSO, I. B.; DIAS, F. C.; MEDEIROS, A. S. R.; FERREIRA, F.; SAMARA, S. I. Títulos de anticorpos anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de bezerras em três rebanhos leiteiros do estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, n. 3. p. 147-152, 2010.

GIANGASPERO, M.; VACIRCA, G.; VAN OPDENBOSCH, E.; BLONDEEL, H. Epidemiological survey on virus diseases of cattle in North West Syria. **Tropicultura**, v. 10, p. 55-57, 1992.

GONÇALVES, D. A.; SPILKI, F. R.; CHIMINAZZO, C.; OLIVEIRA, M. A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 33, n. 5, p. 953-956, 2003.

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

GONÇALVES, R. C. **Estudo clínico e citológico em bezerros clinicamente sadios e portadores de broncopneumonia moderada e grave: o lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico.** 1997. 146 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

GONÇALVES, R. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, D. O. L.; MARCONDES, J. S.; PITUCO, E. M.; DIAS, A. Detection of sérum antibodies to parainfluenza type 3 virus, respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, and herpes virus type 1 in sheep in thr Region of Botucatu, São Paulo – Brazil. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 3, n. 4, p. 1-5, 2011.

GROOMS, D.; BAKER, J. C.; AMES, T. R. Doenças causadas pelo vírus da diarréia viral bovina. In: SMITH, B. P. **Medicina Interna de grandes animais.** 3. ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 707-714.

GRUBBS, S. T.; KANIA, S. A.; POTGIETER, L. N. D. Prevalence of ovine and bovine respiratory syncytial virus infections in cattle determined with a synthetic peptide-based immunoassay. **Journal of Veterinary Investigation**, v. 13, p. 128-132, 2001.

GUARINO, H.; NÚÑEZ, M. V.; GIL, A.; DARGATZ, D. A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, n.1-2, p. 34-40, 2008.

GUARINO, H.; SAIZAR, J. Evaluación rol del laboratorio en el diagnostico de la infeccion por HVB-1 en Uruguay. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL

HERPESVÍRUS BOVINO E DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1998. p. 152.

GUIMARÃES, P. L. S. N.; CHAVES, N. S. T.; SILVA, L. A. F.; ACYPRESTE, C. S. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em bovinos do entorno de Goiânia, em regime de criação semi-extensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p.137-142, 2000.

GUIMARÃES, P. L. S. N.; CHAVES, N. S. T.; SILVA, L. A. F.; ACYPRESTE, C. S. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em bovinos, em regime de criação semi-extensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 35-40, 2001.

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

HAIR JUNIOR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. Tradução Adonai Schlup Sant'Anna. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688 p.

HATAMI, E.; BAKHSHESH, A.; SHOUKRI, M.; GHARAGHOZLOYAN, M. Serological study of bovine herpesvirus type 1 and parainfluenza type 3 in cow farm of Qazvin province based on different ages and seasons. **Archives of Razi Institute**, v. 68, n. 1, p. 53-57, 2013.

HOCHSTEIN-MINTZEL, V.; RIEDEMANN, S.; REINHARDT, G.; NIEDDA, N. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina Relación entre títulos de anticuerpos y dos índices reproductivos en un plantel lechero. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 33. p. 697-703. 1986.

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, H. B. C. R.; CAMPOS, F. S.; SILVA, J. R.; VARELA, A. P. M.; CENCI, A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, p. 137-143, 2003.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 89-107, 1999.

HURTADO, C. B.; URIBE, A. O.; TOUS, M. G. Estudio seroepidemiológico del virus de parainfluenza 3 em bovinos del municipio de Motería (Colombia) com transtornos reprodutivos. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 20, p. 63-70, 2010.

IBU, O. J.; SALIHU, E. A.; ABECHI, M. A.; ABA-ADULUGBA, E. P.; OKEWU, M. Activity of bovine parainfluenza type 3 virus in cattle in north eastern nigeria- a short communication. **Sokoto Journal of Veterinary Scienses**, v. 6, p. 20-23, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. v. 38, p. 165.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná**. Curitiba: IPARDES, 2008. 187 p.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV Virus Taxonomy**. 2013. Disponível em <<http://ictvonline.org/>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

JOHN, A. E. Bovine Parainfluenza-3 Virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 3, p. 575-593, 2010.

JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 79-95, 2003.

JUNQUEIRA, J. R. C.; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*1. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 4701-480, 2006.

KAPIL, S.; BASARABA, R. J. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**, v. 13, p. 455-469, 1997.

KIRKBRIDE, C. A. Managin and outbreak of liverstock abortion 2: diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v. 80, n. 5, p. 70-79, 1985.

KLEM, T. B.; GULLIKSEN, S. M.; LIE, K. I.; LOKEN, T.; OSTERÁS, O.; STOKSAD, M. Bovine respiratory syncytial virus: infection dynamics within and between herds. **Veterinary Record**, v. 173, n. 19, p. 476, 2013.

KRAHL, M.; BRABA, A. C.; OLIVEIRA, L. G.; NETO, J. A. S. P.; PRADO, J. A. P.; ROSA, J. C. A.; WUNDER JÚNIOR, E. Pesquisa de anticorpos para leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Anais...** Gramado, 1997. p. 174.

KRUGER, E. R.; KANTEK, C. E.; PINTO, M. A.; MEDINA, R.; ROCHA, A. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em gado leiteiro na região de Curitiba, PR. **A Hora Veterinária**, v. 75, p. 30- 32,1993.

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

LANGONI, H.; PAES, A. C.; TONIN, F. B.; SILVA, A. V.; DENARDI, M. B. Prevalence of BVD, IBR and PI 3 in bovine by ELISA test. In: VIROLOGIA, 5., 1995, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Virologia, 1995. n. B43.

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

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

LIMA, M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ARANHART, S. Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.1, p. 35-42, 2004.

LINDBERG, A.; BROWNLIE, J.; GUNN, G. J.; HOUE, H.; MOENNIG, V.; SAATKAMP, H. W.; SANDVIK, T. VALLE, P. S. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 25, n. 3, p. 961-979, 2006.

LINDBERG, A.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 55-73, 2005.

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

LUZZAGO, C.; FRIGERIO, M.; PICCININI, R.; DAPRÀ, V.; ZECCONI, A. A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy. **The Veterinary Journal**, v.177, p. 236-241, 2008.

MAILLARD, R.; ASSIE, S.; DOUART, A. Respiratory disease in adult cattle. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice. **Proceedings...** Nice, France, 1996. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/maillard.pdf?LA=1>> Acesso em : 12 jul. 2013.

MAINAR-JAIME, R. C.; HERRANZ, B. B.; ARIAS, P.; VAZQUEZ, R. Epidemiological pattern and risk factors associated with BVDV infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 52, p. 63-73, 2001.

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, p. 197-207, 1999.

MARTIN, S. W.; BOHAC, J. G. The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in Ontario feedlot calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 3, p. 351-358, 1986.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BEUTTEMMÜLLER, E. A.; OLIVEIRA, R. R.; DUCATTI, S. O. Evidência sorológica da infecção de bovinos de corte pelo Herpesvírus Bovino I, na região de Londrina, PR. In: PANVET, 15, 1996, Campo Grande. **Abstracts...** Campo Grande: Panamerican Association of Veterinary Sciences, 1996. p. 172.

MÉDICI, K. C.; MOSCARDI JUNIOR, E.; VICENTE, K.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Identification of antibodies against bovine virus diarrhea virus beef and dairy cattle herds in Paraná State. **Virus Review and Research**, v. 5, n. 1, p. 145, 2000a.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, p. 347-350, 2000b.

MELO, C. B.; OLIVEIRA, A. M.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P. Prevalência de anticorpos contra herpesvírus bovino 1, vírus da diarréia bovina e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do estado de Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p.160-161, 1997.

MENDES, M. B.; BITTAR, J. F. F.; PERREIRA, W. A. B.; CRAVO, G. G.; BITTAR, E. R.; PANETTO, J. C. C.; SANTOS, J. P. Determinação das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8, 2009, Belo Horizonte, **Ciência Animal Brasileira**, supl. I, p. 772-777, 2009.

MOSIER, D. A. Bacterial Pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 483-493, 1997.

MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; MACHADO, J. S.; LIMA, R. M. A.; RICHTZEINHAIN, L. J.; TAKI, E. M. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. **O Biológico**, v. 47, n. 2, p. 55-59, 1981.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINECK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999. 4495 p.

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

NARUMOTO, R. **Situação sanitária de touros residentes em centros de coletade sêmen**. São Paulo. 60 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2013.

NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE. National Agricultural Statistics Service. **Agricultural Statistics Annual**. Washington: NASS, 2006. Disponível em: <<http://nass.usda.gov/>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

NOGUEIRA, F. R. C.; CAMARGO, A. J. R.; RESENDE, O. A. Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa em bovinos no estado do Rio de Janeiro. **PESAGRO.RIO (Comunicado Técnico)**, v. 86, n. 167, p. 1-5, 1986.

NORONHA, R. P.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Pesquisa do vírus da diarreia viral bovina em bovinos jovens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 424-430, 2003.

NORONHA, R. P.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Serum neutralization and viral isolation for bovine diarrhea virus in the state of Bahia. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 1, p. 146, 2001.

OBANDO, C.; BAULE, C.; PEDRIQUE, C.; VERACIERTA, C.; BELAK, S.; MERZA, M.; MORENO-LOPEZ, J. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhea 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.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2013. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/>>. Acesso em: 13 abr. 2014.

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

OLIVEIRA, M. C.; ALEXANDRINO, B.; BORGES, L. A.; MEDEIROS, A. S. R.; AFFONSO, I. B.; DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em vacas gestantes abatidas. **Medicina Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 10-17, 2012.

PACHECO, J. M. C. **Caracterização do perfil de risco e avaliação de práticas de biossegurança em explorações produtoras de leite**. 45 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2010.

PARDON, B.; DE BLEECKER, K.; DEWULF, J.; CALLENS, J.; BOYEN, F.; CATRY, B.; DEPREZ, P. Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. **Veterinary Record**, v. 10, p. 169-278, 2011.

PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; ALENIUS, 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 Records**, v.142, n. 15, p. 385-391, 1998.

PEIXOTO, P. V.; MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; SOUZA, M. I. Infecção natural pelo Vírus Sincicial respiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 171-175, 2000.

PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; LEITE, R. C. Soropositividade para o vírus da diarréia viral bovina e herpes vírus bovino tipo 1 em vacas Zebu no Pantanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, n. 3, p. 375-377, 1997.

PEREIRA, D. F.; OLIVEIRA, S. C. de; PENHA, N. L. J. Logistic regression to estimate the welfare of broiler breeders in relation to environmental and behavioral variables. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 1, p. 33-40, 2011.

PITUCO, E. M. **Ocorrência da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBRIIPV) em rebanhos bovinos criados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais**: utilização das reações sorológicas de microssoroneutralização, microhemaglutinação passiva e da Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-herpesvírus Bovino I. 1988. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Laboratório de Virologia, UFSM, 1998. p. 49-57.

PITUCO, E. M.; STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; PARAVENTI, R. P. V.; BILYNSKYJ, M. C. V. Modelo alternativo para erradicação da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/ Vulvovaginite Infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 64, n. 17, p. 29, 1997.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HUBNER, S. O.; VARGAS, G. D'AVILA.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.** 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. 2156 p.

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

RAVAZOLLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. **Arquivo da Faculdade de Veterinária – UFRGS**, v. 17, p. 89-95, 1989.

REBHUN, W. C. **Doenças do gado leiteiro.** São Paulo: Editora Roca, 2000. 462p.

REED, L. J.; MUENCH, H. A. A simple method of estimating fifty percent end points. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; ERNST, S.; AGUILAR, M.; RIQUELME, S.; GALLARDO, J. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea/mucosal disease in southern Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v.10, p. 73-78, 1990.

REISINGER, R. C.; HEDDLESTON, K. L.; MANTHEI, C. A. A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 135, p. 147-152, 1959.

RIBEIRO, M. B.; GALVÃO, C. L.; COSTA, A. R.; RODRIGUES, F. M.; SUZART, J. C. C. **Infecções pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa, diarreia viral bovina e parainfluenza 3, detectados por meio de avaliação sorológica no Estado da Bahia**. Salvador: EMBRAPA, 1987. (Boletim Técnico, 11).

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

RICHTZEINHAIN, L. J.; ALFIERI, A. A.; LEITE, R. C.; WEIBLEIN, R.; MORO, E.; UMEHARA, O. Pesquisa de anticorpos séricos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em fêmeas bovinas de propriedades com histórico de problemas reprodutivos, localizadas em 21 estados brasileiros. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 66, supl., p. 127, 1999a.

RICHTZEINHAIN, L. J.; BARBARINI, O.; UMEHARA, O.; DE GARCIA, S. A.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA, F. Rinotraqueíte infecciosa bovina: levantamento sorológico nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, n. 1, p. 83-88, 1999b.

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

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; WEIBLE, R.. Viroses confundíveis com Febre Aftosa. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.

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

ROMERO-SALAS, D.; AHUJA-AGUIRRE, C.; MONTIEL-PALACIOS, F.; GARCIA-VÁZQUEZ, Z.; CRUZ-ROMERO, A.; AGUILAR-DOMINGUEZ, M. Seroprevalence and risk factors associated whit infectius bovine rhinotracheitis in unvaccinated cattle in southern Veracruz, Mexico. **African Jounal of Microbiology Research**, v. 7. p. 1716-1722, 2013.

RUIZ, J.; JAIME, J.; VERA, V. Latencia del herpesvirus bovino- 1: El papel de los transcritos relacionados com latencia (RL). **Acta Biologica Colombiana**, v. 13, n. 1, p. 3-22, 2008.

SAA, L. R.; PEREA, A.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS, A. J.; JARA, D. V.; RAMOS, R.; CARBONERO, A. Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrheavirus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 3, p. 645-649, 2012.

SAKHAEE, E.; KHALILI, M.; KAZEMI, N. I. A. S. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 10, n.1, p. 49-53, 2009.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 369-403, 2004.

SANTOS, M. R.; FERREIRA, H. C. F.; SANTOS, M. A.; SARAIVA, G. L.; TAFURI, N. F.; SANTOS, G. M.; TOBIAS, F. L.; MOREIRA, M. A. S.; ALMEIDA, M. R.; JUNIOR, A. S. Antibodies against *Bovine herpesvirus 1* in dairy herds in the state of Espírito Santo, Brasil. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 280-283, 2014.

SARDI, S. I.; CAMPOS, G. S.; BARROS, S. B.; EDELWEISS, G. L.; MARTINS, D. T. Detecção de anticorpos contra o vírus da parainfluenza bovina 3 (pi-3) e o vírus da leucose bovina (vlb) em bovinos de diferentes municípios do Estado da Bahia, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 61-65, 2002.

SARRAZIN, S.; VELDHUIS, A.; MÉROC, E.; VANGEEL, I.; LAUREYNS, J.; DEWULF, J.; CAIJ, A. B.; PIEPERS, S.; HOOYBERGHS, J.; RIBBENS, S.; VAN DER STEDE, Y. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. . **Preventive Veterinary Medicine**, v.108, p. 28-37, 2013.

SHAHRIAR, F. M.; CLARK, E. G.; JANZEN, E.; WEST, K.; WOBESER, G. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 863-868, 2002

SILVA, A. D.; GONÇALVES, D. A.; SPILKI, F. R.; CHIMINAZZO, C.; OLIVEIRA, M. A.; FRANCO, A. C.; ROEHE P. M. Isolamento do vírus parainfluenza tipo 3 em aborto bovino no Estado de Goiás (GO). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado, 2002. p. 29.

SILVA, F. F.; CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H.; ABREU, S. R. O.; MUNIZ, A. M. M. Anticorpos neutralizantes contra o HVB-1 em bovinos do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 597-599, 1995.

SNEDECOR, G. W. ; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. 7. ed. Ames: Iowa State University Press, 1980. p. 210.

SNOWDER, G. D.; VAN VLECK, L. D.; CUNDIFF, L. V.; BENNETT, G. L. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1999-2008, 2006.

SOLIS-CALDERON, J. J.; SEGURA-CORREA, J. C.; AGUILAR-ROMERO, F.; SEGURA-CORREA, V. M. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 82, p. 102-107, 2007.

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

SOUSA, V. E.; BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da Ilha de São Luis-MA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2009.

SOUSA, V. E.; CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da ilha de São Luís-MA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado, 2008.

SPIPKI, F. R.; ALMEIDA, R. S.; DOMINGUES, H. G.; D'ARCE, R. C. F.; FERREIRA, H. L.; CAMPALANS, J.; COSTA, S. C. B.; ARNS, C. W. Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. **Virus Research**, v. 116, p. 30-37, 2006.

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

SPIILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; LIMA, M.; FRANCO, A. C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P. M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 43-49, 2004.

STAHL K.; RIVERA H.; VÅGSHOLM I.; MORENO-LOPEZ J. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p. 193-202, 2002.

STAHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe — an update. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 31-39, 2012.

STURZA, D. A. F.; ANZILIERO, D.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Testes de ELISA e virusneutralizaçãona detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 985-990, 2011.

SUAREZ-HEILEIN, A. S.; METZLER, A. E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A. A.; RODRIGUEZ, M. Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **Journal Veterinary Medicine**, v. 40, p. 125-130, 1993.

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

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

TALAFHA, A. Q.; HIRCHE, S.M.; ABABNEH, M. M.; AL-MAJALI, A. M.; ABABNEH, M. M. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 499-506, 2009.

TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P.; SCHNIDT, C. S.; SPILK, F. R.; SILVA, T. C.; DOTTA, M. A.; ROEHE, P. M. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 33-37, 2001.

THOMPSON, J. A.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; MIRANDA, R. H. L. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, p. 290-301, 2006.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology**. 9. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2012. 568 p.

TONIN, F. B.; LAGONI, H.; PAES A. E.; DA SILVA, A. V. Prevalence of IBR and BVD/DM in Bovine by ELISA test. In: PANVET, 15., 1996, Campo Grande, **Abstracts...**Campo Grande: Panamerican Association of Veterinary Sciences, 1996, p. 277.

VALARCHER, J. F.; HÄGGLUND, S. Viral respiratory infections in cattle. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice, France. **Proceedings...** Nice, 2006. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/valarcher.pdf?LA=1>> Acesso em: 12 jul. 2013.

VAN REENEN, C.; MARS, M.; LEUSHUIS, I.; RIJSEWIJK, F.; VAN OIRSCHOT, J.; BLOKHUIS, H. Social isolation may influence responsiveness to infection with bovine herpesvirus 1 in veal calves. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 135-143, 2000.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, n. 2, esp., p. 51-58, 1974.

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

VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. L. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1(BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 131-137, 2003.

WIZIGMANN, G.; VIDOR T.; RICCI, Z. M. T. Investigações Sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus da diarreia a vírus-enfermidade das mucosas dos bovinos, no estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 1, p. 52-58, 1972.

YATES, W. D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral bacteria synergism in respiratory disease. **Canadian Journal Comparative Medicine**, n. 46, p. 225, 1982.

YAVRU, S.; SIMSEK, A.; YAPKIC, O.; KALE, M. Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract. **Acta veterinária**, v. 55, n. 2-3, p. 219-226, 2005.

YOUSEF, M. R.; MAHMOUD, M. A. E. F.; ALI, S. M.; AL-BLOWI, M. H. Seroprevalence of some bovine viral respiratory diseases among non vaccinated cattle in Saudi Arabia. **Veterinary Word**, v. 6, n. 1, p.1-4, 2013.

9 ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para **Pesquisa Veterinária Brasileira**.

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o

trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo e todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Trabalho

Prevalência do Vírus da Diarreia Viral Bovina em bovinos leiteiros da raça Holandesa, no Estado do Paraná¹

Daniella Sponchiado*²; Bianca P. Santarosa²; Andreza A. da Silva³; Edviges M. Pituco⁴; Maira S.N. Martins⁴; Vivian S.C. Pinto⁴; Ivan R. Barros Filho⁵; Roberto C. Gonçalves²

ABSTRACT.- Sponchiado D., Santarosa B.P., Silva A.A., Pituco E.M., Martins M.S.N., Pinto V.S.C., Barros Filho I.R. & Gonçalves R.C. 2014. **[Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus in dairy cattle of Holstein, in Paraná state.]** Prevalência do Vírus da Diarreia Viral Bovina em bovinos da raça Holandesa, no Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00*. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: dsponchiado@yahoo.com.br

The Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is widespread in Brazil. Considering the importance of the disease, a serological survey of BVDV was performed in Holstein Black and White cattle created in Paraná state. 714 blood samples were collected by jugular vein puncture of unvaccinated animals for the agent studied, with more than six months of age, from 26 dairy farms, distributed in 17 municipal districts from four regions (Southwest, West, East Central and other regions). Alongside the collection, it was used a questionnaire for each property studied in order to assess the risk factors associated with viruses examined. The serum samples were subjected to the diagnosis test of virus neutralization at the Laboratory of Viral Diseases of Cattle of the Biological Institute of São Paulo. Results were classified as positive for BVDV when titles were equal to or more than 1:10. Of the samples analyzed, 35.8% (256/714) were positive and 88.5% (23/26) of the properties, had title for BVDV. Considering the risk factors for viral dissemination were analyzed: type of management adopted - 15.11% (13/86) of seropositivity in animals reared extensively, 30% (158/527) in cattle reared in semi-intensive way and 84.15% (85/101) in intensive way; age - animals from seven to 24 months of age 28.03% (67/239) were seropositive, with 25 to 48 months of age 41.05% (78/190) were positive; those over 48 months showed 38.94% (111/285) of positivity; number of animals - properties with up to 50 animals showed 20.48% (17/83) of seropositivity, between 51 and 100 animals showed 25.05% (115/459) of seropositivity, and properties with more than 100 animals showed 72.09% (124/172) of seropositivity. After logistic regression analysis, risk factors associated with BVDV were: cattle older than 48 months (OR = 4.407; 95% CI 2.456 to 7.906), Southwest region (OR = 52.388; 95% CI 4.629 to 5892.873) semi-intensive production system (OR = 1.333; 95% CI 0.261 to 6.815), property with number less than or equal to 50 animals (OR = 16.682; 95% CI 3.218 to 86.481), incoming cattle percentage higher than 10% (OR = 17.56; 95% CI 7.613 to 40.506) and sharing of pasture with neighbors (OR = 9.148; 95% CI 3.751 to 22.310). From the observation of the risk factors and the prevalence of the virus in herds, prevention and control measures can be taken to avoid losses in dairy cattle in the state.

INDEX TERMS: respiratory diseases, dairy cattle, Bovine Viral Diarrhea, virus neutralization.

RESUMO.- O vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) está amplamente disseminado no Brasil. Considerando a importância da enfermidade, realizou-se a prevalência do BVDV em bovinos da raça

¹Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

²Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. *Autor para correspondência: dsponchiado@yahoo.com.br

³Departamento de Medicina e Cirurgia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, RJ 23890-000 Brasil.

⁴Laboratório de Virose de Bovídeos do Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP 04014-002 Brasil.

⁵Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Curitiba, PR 80035-050 Brasil.

Holandesa variedade Preta e Branca criados no estado do Paraná. Colheram-se 714 amostras de sangue pela punção da veia jugular de animais não vacinados para o agente estudado, com mais de seis meses de idade, de 26 propriedades leiteiras, distribuídas em 17 municípios paranaenses pertencentes a quatro regiões (Sudoeste, Oeste, Centro Oriental e demais regiões). Paralelamente à colheita, aplicou-se um questionário em cada propriedade estudada, com a finalidade de avaliar os fatores de risco associados ao vírus examinado. As amostras sorológicas foram submetidas ao teste de diagnóstico de virusneutralização no Laboratório de Viroses de Bovinos do Instituto Biológico de São Paulo. Os resultados foram classificados como positivos para BVDV quando os títulos foram iguais ou maiores que 1:10. Das amostras analisadas, 35,8% (256/714) foram positivas e, 88,5% (23/26) das propriedades, apresentavam título para BVDV. Considerando-se os fatores de risco para a disseminação viral analisou-se: tipo de manejo adotado - 15,11% (13/86) de soropositividade em animais criados de forma extensiva, 30% (158/527) em bovinos criados em semi-intensiva e 84,15% (85/101) em intensiva; idade - animais de sete a 24 meses 28,03% (67/239) foram sororreagentes, os de 25 a 48 meses 41,05% (78/190) foram positivos; os acima de 48 meses tiveram 38,94% (111/285) de positividade; número de animais - propriedades com até 50 bovinos apresentaram 20,48% (17/83) de soropositividade, entre 51 a 100 animais 25,05% (115/459) foram positivos, com mais de 100 animais 72,09% (124/172) de sororreagentes. Após análise de regressão logística os fatores de risco associados ao BVDV foram: bovinos com idade maior que 48 meses (OR=4,407; IC95% 2,456 - 7,906), região Sudoeste (OR=52,388; IC95% 4,629 - 5892,873), sistema de produção semi-intensivo (OR=1,333; IC95% 0,261 - 6,815), propriedade com número de animais menor ou igual a 50 bovinos (OR=16,682; IC95% 3,218 - 86,481), percentual de entrada maior que 10% de bovinos (OR=17,56; IC95% 7,613 - 40,506) e compartilhamento de pasto com os vizinhos (OR=9,148; IC95% 3,751 - 22,310). A partir da observação dos fatores de risco e a prevalência do vírus nos rebanhos medidas de prevenção e controle podem ser adotadas para evitar perdas na bovinocultura leiteira do estado.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: doenças respiratórias, gado de leite, Diarreia Viral Bovina, virusneutralização.

INTRODUÇÃO

O Paraná se destaca no cenário nacional pela produção de 3.597.775.000 litros/ano de leite, o que corresponde a 11,7 % da produção brasileira. O estado é o terceiro com maior produção no Brasil (IBGE 2010), onde as propriedades são heterogêneas, porém 51% dos animais dos rebanhos possuem características da raça Holandesa (IPARDES 2008).

Dentre os problemas enfrentados pelos produtores leiteiros no mundo destacam-se atualmente as enfermidades respiratórias, responsáveis por perdas econômicas relacionadas à diminuição da produção, retardo do crescimento, diminuição da conversão alimentar e morte dos animais acometidos (NASS 2006).

As doenças respiratórias causam alto índice de morbidade entre os bovinos (Farshid et al. 2002, Snowden et al. 2006). A frequente exposição do sistema respiratório às variações climáticas, agentes irritativos e microrganismos patogênicos somados às particularidades do trato respiratório dos bovinos predispõem esta espécie às doenças inflamatórias pulmonares (Mosier 1997). Dentre as principais doenças infecciosas, que acometem o sistema respiratório, as pneumonias são as principais causas de morte em bovinos de até um ano de idade (Assis-Brasil et al. 2013). Os agentes virais são de importância crucial nas doenças respiratórias dos bovinos. Na maioria das vezes, os vírus iniciam a infecção rompendo barreiras, atuam na imunossupressão do indivíduo acometido, facilitando assim, a entrada de agentes oportunistas como as bactérias (Martin e Bohac 1986).

De maneira geral o rebanho leiteiro apresenta maior frequência de doenças respiratórias que o rebanho de corte, uma vez que a forma de manejo pode facilitar a transmissão dos agentes infecciosos (Houe 1999). Sistemas de produção mais intensivos adotados em propriedades com alta tecnologia, com maior lotação por metro quadrado, falta de ventilação e outros agentes predisponentes, permitem maior exposição aos agentes determinantes às afecções respiratórias. O aumento na concentração de ureia no ambiente pode lesionar o epitélio respiratório, facilitando a entrada de vírus e/ou bactéria, por exemplo (Rebhun 2000).

Com os esforços da Defesa Sanitária do Estado do Paraná no controle e erradicação da Febre Aftosa para alcançar o status de "Área Livre sem Vacinação" e exigências sanitárias internacionais crescentes, ressalta-se a importância do controle das afecções como Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa. O Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) se manifesta de várias

formas clínicas: subclínica, infecções respiratórias, gastroenterite, alterações cutâneas, trombocitopenia e hemorragias, problemas reprodutivos (retorno de cio, nascimento de bezerros fracos, malformações congênitas e natimortos) e, a forma altamente fatal que ocorre principalmente em animais persistentemente infectados (PI), que é a afecção denominada Doença das Mucosas (DM) (Ramsey e Chivers 1956, Baker 1995, Flores et al. 2005).

O primeiro relato da DM no Brasil foi no Estado de São Paulo, descrito por Correa et al. (1968). Após seis anos, o vírus foi isolado inicialmente em bezerros, no Rio Grande do Sul (Vigor, 1974). No estado do Paraná a prevalência viral fica em torno de 50 a 73% das amostras estudadas (Médici et al. 2000a, Biogenesis-Bagó, 2008). No sudeste, a prevalência varia de 35,9% a 86,4% (Langoni et al. 1995, Alexandrino et al. 2011). Pituco e Del Fava (1998), após analisarem 4065 soros bovinos provenientes de animais com quadro reprodutivo, determinaram que 47,7% das amostras foram reagentes ao teste diagnóstico. Na maioria dos estudos existentes no Brasil a forma reprodutiva da doença estava envolvida (Pituco e Del Fava 1998, Guimarães et al. 2000, Brito et al. 2002, Biogenesis-Bagó 2008, Chaves et al. 2010), porém é importante ressaltar que o BVDV é um dos agentes causadores de afecções respiratórias responsáveis por grandes perdas econômicas no mundo (Valarcher e Hägglund 2006).

Diversos fatores de risco estão associados às doenças virais respiratórias como tamanho do rebanho, introdução de animais sem exame prévio, idade dos animais, tipo de manejo, densidade populacional, associações com outros vírus, altitude, assistência técnica e compra de touros (Dias et al. 2008, Carbonero et al. 2011, Bezerra et al. 2012, Chaves et al. 2012).

Levando-se em conta o destaque do estado do Paraná na produção leiteira brasileira, a importância das doenças respiratórias e poucos dados na literatura nacional que correlacionem o BVDV aos possíveis fatores de riscos para disseminação, é de suma importância a realização de estudos envolvendo avaliações sorológicas dos rebanhos de bovinos para verificar a prevalência viral destas doenças respiratórias em bovinos leiteiros, assim como identificar seus fatores de risco. A partir disto, pode-se estabelecer um plano de controle eficiente e prevenir estas afecções, diminuindo as perdas econômicas.

Tendo em vista a grande relevância do estado do Paraná na bovinocultura brasileira, este trabalho teve como objetivo: verificar a prevalência de BVDV em bovinos e em propriedades leiteiras da raça Holandesa variedade Preta e Branca (HPB) no estado do Paraná, assim como a estudar fatores de risco associados a bovinos reagentes para BVDV.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área do estudo

O Paraná está localizado na Região Sul do Brasil, entre os paralelos de 22°29' 30" e 26° 42' 59" de latitude sul, e entre as longitudes a Oeste de 48° 02' 24" e 54°37' 38", compreendendo uma área de 199.307km². A temperatura varia de 15 a 24°C com precipitações de 1200 a 3500mm e umidade relativa do ar de 56 a 85%. O Estado pode ser dividido em dois tipos de clima, o subtropical e o temperado. O rebanho leiteiro bovino do Paraná é composto por 2.852.264 bovinos e cerca de 51% destes são considerados da raça Holandesa, sendo esta a raça leiteira com maior frequência no estado (IPARDES, 2008).

Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi determinado segundo Agranonik e Hirakata (2011), utilizando a seguinte fórmula:

$$n = p.(1-p).Z^2/E^2$$

Onde:

n = número de amostras a serem utilizadas

Z = fator determinante do grau de confiança (1,96)

p = prevalência esperada

E = margem de erro admissível

Como prevalência esperada admitiu-se 50,0% (Biogenesis-Bagó 2008), erro aceitável de 5%, nível de confiança de 95% e DEFF (*Desing Effect*) de 1,5. Totalizando o número amostral mínimo de 576 amostras.

Animais

Foram utilizados 714 bovinos, fêmeas, da raça HPB, com idade superior a seis meses, provenientes de 26 propriedades leiteiras, distribuídas em dezessete municípios do Estado do Paraná. No Paraná, três bacias se destacam na produção de leite: Centro-Oriental, Oeste e Sudoeste. Estas três bacias envolvem 95 municípios, concentram 48,5% dos produtores e são responsáveis por 53% da produção estadual de leite. As demais regiões do estado são englobadas como uma única região (IPARDES, 2008). A escolha das propriedades seguiu o critério de inclusão amostral e a divisão do Paraná citada anteriormente. Todas as propriedades realizavam exames de Brucelose e Tuberculose Bovina periódicos, vacina de brucelose nas fêmeas de três a oito meses, ordenha mecânica duas vezes ao dia e média de produção leiteira de 20 litros/vaca/dia. A Figura 1 demonstra distribuição das propriedades e municípios onde foram realizadas as coletas amostrais. O Quadro 1 demonstra o número de propriedades e amostras coletadas em cada município.

Desenho do estudo

O estudo foi conduzido durante o período janeiro de 2007 a dezembro de 2012. As propriedades que participaram da pesquisa foram identificadas de 1 a 26 e escolhidas de forma não aleatória, pois seguiram os critérios de inclusão amostral. As amostras de sangue foram colhidas de forma aleatória, sendo que foi coletado no mínimo 10% dos animais de cada propriedade.

Critério de inclusão amostral

As amostras analisadas originaram-se de rebanhos leiteiros compostos por animais da raça HPB, com idade maior que seis meses para evitar a interferência de anticorpos colostrais (Tizard 2012) e, sem histórico de uso de vacinas de vírus vivos ou mortos, para o vírus respiratório estudado.

Colheita e armazenamento das amostras

Amostra de sangue total de cada animal foi obtida pela punção da veia jugular, empregando-se o sistema o vácuo em tubo siliconizado de 10mL, sem anticoagulante. Após a formação do coágulo sanguíneo, as amostras foram centrifugadas a 600 x G por 15 minutos e o soro resultante foi armazenado em tubos plásticos identificados, com capacidade de 1,5mL. Os tubos plásticos foram mantidos a -20°C e posteriormente transportados até Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo (LVB-IB).

No laboratório, as amostras de soro foram armazenadas a -20° C até o momento do processamento. Antes da realização do teste de virusneutralização (VN) os soros foram colocados em banho-maria a 56°C por 30 minutos para a inativação do complemento

Fatores de risco

Os proprietários e/ou responsáveis pelas propriedades foram entrevistados, através de questionário estruturado, com intuito de se avaliar a propriedade quanto as seguintes variáveis: tipo de produção (intensiva, semi-intensiva, extensiva), número de animais na propriedade (menor ou igual a 50, 51 a 100, maior que 100 bovinos), lotação (menor ou igual a dois, três e maior que três bovinos por hectare), área da propriedade (menor ou igual a 25, 26 a 50 e maior que 50 hectares), monta natural (sim/não), inseminação artificial (sim/não), reutilização de agulhas e seringas (sim/não) e reutilização de luva de palpação (sim/não), participação em feiras e/ou exposições (sim/não), compartilhamento de pasto com vizinhos (sim/não), percentual de entrada e saída de bovinos (menor ou igual a 5%, 6% a 10% e maior que 10%). Com os dados relativos à movimentação dos animais calculou-se o percentual de entrada e saída de bovinos do rebanho, por meio de uma operação simples de regra de três: n° animais da propriedade - 100%; n° de entradas/saídas - x%.

Virusneutralização

As amostras de soro foram testadas para o vírus BVDV pela da técnica de virusneutralização (VN), seguindo recomendações do Manual de testes diagnósticos e vacinas de animais terrestres (OIE 2013), no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo – São Paulo. A estirpe viral utilizada foi BVDV-1 NADL, isolado na “National Animal Disease Laboratory” (ATCC® VR-534™), cedida gentilmente pelo Instituto de Virologia da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha. A quantificação de anticorpos foi realizada em 96 poços de placas de microtitulação utilizando-se oito diluições em série a partir de 1:10 a 1:1280. Cem TCID_{50/50mL} foram adicionados a estirpe de viral (BVDV/NADL cepas fornecidas pelo Instituto de Virologia, em Hannover, Alemanha). As placas de microtitulação foram incubadas a 37° C com

5% de CO₂ durante 1 hora. Após isso, 50uL de suspensão de células do epitélio de rim bovino (MDBK) foram adicionados a uma concentração de 3x10⁵ células/mL. As microplacas foram incubadas a 37° C com 5% de CO₂ durante 72 horas, quando as leituras foram realizadas. A VN foi validada por meio de retitulação e controle e da dose viral de volta (recomendado 100 TCID₅₀ com variação aceitável de 20-300 TCID₅₀), das células controle e pelos resultados de soros padrões positivos e negativos. Os resultados do teste sorológico são expressos como o inverso da diluição de soro capaz de neutralizar o vírus em 50% dos poços. Os títulos foram calculados de acordo com o método de Reed e Muench (1938). Os animais foram considerados reagentes para o BVDV quando tinham títulos iguais ou superiores a 1:10.

Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foram utilizados os testes do Qui-quadrado e Exato de Fisher (Snedecor e Cochran 1980). Os dados obtidos neste estudo foram expressos por meio da prevalência de ocorrência de bovinos portadores de anticorpos contra o BVDV. O nível de significância foi fixado em 5%.

Após os dados estarem tabulados, as variáveis foram analisadas por meio da regressão logística. De acordo com Hair et al. (2009), este tipo de análise explica as variáveis que são categóricas e tem a vantagem de ser menos afetadas quando a variável em estudo não está com distribuição normal. O modelo de regressão logística analisa um conjunto de variáveis independentes não categóricas, para tentar prever uma variável dependente categórica (Pereira et al. 2011). Neste trabalho, a ocorrência de bovinos sororreagentes ou não ao teste diagnóstico foi classificada como uma variável dependente, do tipo dicotômica (0 – negativos/1 – positivos) e as demais variáveis foram classificadas como variáveis quantitativas explicativas. Ao final do ajuste, foi calculada a sensibilidade (proporção de verdadeiros positivos) e especificidade (proporção de verdadeiros negativos) que foram demonstrados por meio da curva ROC (Receiver Operator Characteristic Curve).

Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/UNESP-Campus Botucatu, sob protocolo número 220/2012 – CEUA.

RESULTADOS

Prevalência dos bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca sororreagentes ao BVDV e das propriedades estudadas

A prevalência de animais reagentes nas 714 amostras de soro bovino da raça HPB colhidas em propriedades leiteiras do estado do Paraná para o BVDV foi de 35,8%.

Das propriedades estudadas 26/23 (88,3%) apresentaram pelo menos um animal sororreagentes ao BVDV.

Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme os sistemas de produção

Com relação ao sistema de produção utilizado em cada propriedade observou-se que bovinos criados em sistema intensivo apresentaram maior prevalência de BVDV (84,15%) que animais que foram criados em sistema semi-intensivo (30,00%) e extensivo (15,11%) (Quadro 2).

Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme a idade dos bovinos estudados

Houve maior prevalência de animais positivos ao teste de VN entre os animais pertencentes a faixa etária 25 a 48 meses de idade (41,05% - 78/190) (Quadro 3).

Prevalência de bovinos reagentes ao BVDV conforme o manejo

Neste estudo observou-se que a prática de realização de inseminação artificial apresentou prevalência de 37,29% (247/664) de animais soropositivos, enquanto que o hábito da reutilização de luvas de palpação a prevalência foi de 42,16% (248/584) para o vírus estudado. Nas propriedades onde os animais tem como manejo o compartilhamento de pasto com vizinhos, os bovinos apresentaram prevalência de 43,31% (81/187) (Quadro 4).

Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme as características das propriedades e a movimentação de animais

O estudo detectou que a prevalência de bovinos sororreagentes ao BVDV foi mais elevada nas propriedades com maior número de animais, sendo 72,09% (172/124) a maior prevalência observada em propriedades mais de 100 animais (Quadro 5).

Com relação à área da propriedade, foi observado que propriedades com mais de 50 hectares apresentaram prevalência de positivos de 63,57% (89/104), seguidas de propriedades com menor ou igual a 25 hectares e de 26 a 50 hectares, com prevalências de 31,36% (90/287) e 23,62% (77/323), respectivamente (Quadro 5).

Considerando o percentual de entrada de animais na propriedade, os resultados desse estudo demonstraram que quanto maior o percentual de entrada, maior a prevalência de animais positivos para BVDV, com prevalências mais elevadas em propriedades com percentual de entrada maior que 10% (56,12% - 110/196) e menores, em propriedades com percentual de entrada menor ou igual a 5% (99/360 - 25%). Fato semelhante aconteceu com o percentual de saída dos animais da propriedade, sendo observado que a prevalência de bovinos soropositivos se elevou conforme aumentava o percentual de saída de animais da propriedade, dados que se encontram resumidos no Quadro 4.

Modelo de regressão logística para o BVDV

Foi possível verificar que o modelo ajustado foi considerado significativo ($r^2=0,532$; AIC = 617,362; $p<0,0001$), sendo que as variáveis analisadas foram: região, sistema produção, número de animais, área da propriedade, idade dos animais estudados, percentual de entrada e saída de animais, reutilização de luva de palpação e compartilhamento de pasto com vizinhos (Quadro 6).

A partir deste modelo verificou-se que a região Sudoeste apresenta 52 vezes mais chances de obter bovinos infectados pelo BVDV do que as outras regiões envolvidas no estudo (OR=52,388; IC95% 4,629 - 5892,873). O sistema de produção semi-intensivo apresentou 1,33 mais chances de possuir animais infectados quando comparado ao sistema de produção intensivo (OR=1,333; IC95% 0,261 - 6,815). Sobre o número de animais, os pertencentes a propriedades com total igual ou menor que 50 bovinos apresentam 16,682 vezes mais chances de serem soropositivos para o BVDV, quando comparado aos bovinos de propriedades com total superior a 100 animais (OR=16,682; IC95% 3,218 - 86,481).

Propriedades com área igual ou menor que a 25 hectares e entre 26 e 50 hectares apresentaram um caráter protetor, apresentando OR igual a 0,007 e 0,009, respectivamente. Com relação a idade dos animais, verificou-se que os bovinos com idade superior a 48 meses apresentaram 4,407 vezes mais risco de estarem infectados com o vírus BVDV do que os animais mais jovens (OR=4,407; IC95% 2,456 - 7,906). Quanto ao percentual de entrada de animais nas propriedades, verificou-se que em rebanhos onde o percentual era superior a 10%, os bovinos apresentaram 17,56 vezes mais risco de exposição ao vírus, quando comparados às propriedades com percentual de entrada superior a 10% de animais (OR=17,56; IC95% 7,613 - 40,506). Já para o percentual de saída de bovinos das propriedades, verificou-se que em rebanhos com percentual de saída maior que 10% de animais o risco de exposição dos animais ao BVDV era 5,266 vezes maior (OR=5,266; IC95% 1,131 - 24,507).

Sobre a reutilização da luva de palpação, as propriedades onde esse manejo não era empregado apresentavam um fator de proteção de OR=0,107 (IC95% 0,034 - 0,334). Por fim, com relação ao compartilhamento de pastos com os vizinhos, os animais de propriedades que mantinham esse tipo de manejo apresentaram 9,148 vezes mais risco de estarem infectados com o BVDV.

Por meio da elaboração da curva ROC, verificou-se que a explicabilidade e aceitação do modelo é de 88,9%, sendo sua especificidade equivalente a 91,27% (percentual de acerto do diagnóstico negativo, ou seja, o verdadeiro negativo), e sua sensibilidade equivalente a 64,45% (percentual de acerto do diagnóstico positivo, ou seja, o verdadeiro positivo) (Figura 2).

Os resultados obtidos pela forma univariada e descritiva do BVDV revelaram diferenças significativas dos resultados compilados nos Quadros 2 a 6.

DISCUSSÃO

Prevalência de bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca sororreagentes ao BVDV

O vírus BVDV foi diagnosticado nos animais leiteiros de raça HPB do Estado do Paraná, porém sua ocorrência é menor que a anteriormente observada, que variou de 50 a 73,5% (Richtzeinhain 1997, Médici et al. 2000a, Flores et al. 2005, Biogenesis-Bagó 2008). A ocorrência do

BVDV no presente estudo também foi menor que os 66,3% encontrados por Quincozes et al. (2007) e os 57,7% de Frandoloso et al. (2008), ambos no estado do Rio Grande do Sul e aos 52,5% encontrados por Oliveira et al. (2012) em São Paulo e Minas Gerais.

Dentre as justificativas para menor prevalência do vírus nos rebanhos estudados no presente trabalho pode-se dizer que não foram utilizadas amostras tendenciosas, ou seja, provenientes de rebanhos com sinais aparentes de doenças respiratórias ou reprodutivas, vacinados contra o vírus pesquisado assim como a menor prevalência encontrada no estudo pode ser devido o fato da estirpe viral (BVDV-1 NADL) utilizada para diagnóstico ocorrer com menor prevalência no Estado do Paraná.

Por outro lado, a prevalência para o vírus BVDV observada neste trabalho foram semelhantes aos 34,0% de Biogenesis-Bagó (2008) em Santa Catarina, aos 35,2% de Brito et al. (2002) em Goiás, aos 39,5% de Langoni et al. (1995) em São Paulo e aos 39,3% de Flores et al. (2005) no Rio Grande do Sul. Já trabalhos realizados na região Nordeste nos estados da Bahia (14,6%), Paraíba (22,2%) e Maranhão (27,6%) apresentaram resultados menores aos encontrados neste estudo (Ribeiro et al. 1987, Thompson et al. 2006, Sousa et al. 2008). O manejo das propriedades, o nível de tecnificação das mesmas, assim como o clima regional podem justificar as diferentes prevalências encontradas na literatura.

Prevalência das propriedades para BVDV

A prevalência do BVDV nas propriedades estudadas foi semelhante aos 88,3% no estado de Goiás (Brito et al. 2010), onde se examinaram amostras de animais não vacinados. Também foi próximo aos 80,7% observados na Jordânia (Talaflha et al. 2009). Maiores prevalências de rebanho foram observadas no estado de Goiás 100% (Guimarães et al. 2000); Maranhão 91,66% a 100% (Chaves et al. 2009, Sousa et al. 2009). Prevalências menores foram encontradas no estado de Goiás 70,3% (Brito et al 2002); Rio Grande do Sul 57,7% (Frandoloso et al. 2008) e os 60% e 47,1% em rebanhos da México e Bélgica, respectivamente (Solis-Calderon et al. 2005, Sarrazin et al. 2013).

Sistema de produção

As propriedades com sistema intensivo apresentaram maior prevalência para BVDV, concordando com os resultados de Brito et al. (2010) no estado de Goiás. Pacheco (2010) relatou que o sistema de produção foi considerado como um fator de risco para BVDV em rebanhos de Portugal. Segundo Flores (2003) a transmissão viral ocorre por contato direto ou indireto. No sistema intensivo, o contato direto entre os animais ocorre com mais frequência possibilitando assim, maior chance de transmissão viral.

Os resultados deste estudo discordam dos relatos de Quincozes et al. (2007) no Rio Grande do Sul e Samara et al. (2004) em Minas Gerais. Estes autores demonstraram que rebanhos criados de forma extensiva apresentaram maior número de bovinos sororreagentes, e atribuíram este fato à falta controle sanitário levando assim a disseminação do vírus e à baixa tecnificação das propriedades estudadas.

Idade dos animais

As maiores prevalências de bovinos sororreagentes no presente estudo ocorreram em animais com idade maior que 24 meses e menor ou igual a 48 meses. De acordo com Mainar-Jaime et al. (2001) o aumento da frequência de animais sororreagentes está diretamente relacionado com o aumento da idade dos animais. Brito et al. (2010) relacionou a idade com a soropositividade entre os animais estudados. Estes autores salientaram que animais adultos apresentam maior prevalência por terem maior período de contato com agente.

Os resultados deste estudo corroboraram com os de Castro et al. (1993) em Pernambuco, os quais observaram maiores prevalências em vacas maiores que 24 meses. Sousa et al. (2009) e Chaves et al. (2009), ao realizarem estudos em rebanhos leiteiros não vacinados do Maranhão, obtiveram a prevalência de 39,74% e 41,94% de bovinos positivos, nas faixas etárias de três e sete anos, respectivamente. Segundo estes autores a maior prevalência nessa faixa etária foi relacionada ao fato dos animais estarem no pico de suas atividades produtivas e reprodutivas.

Quincozes et al. (2007) no Rio Grande do Sul, assim com Alexandrino et al. (2011) em Minas Gerais e São Paulo, Solis-Calderon et al. (2005), no México, e para Talaflha et al. (2009) na Jordânia, não observaram diferença significativa entre as faixas etárias dos bovinos sororreagentes avaliados em seus estudos.

Características de manejo

Almeida et al. (2013), em rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, consideraram a inseminação artificial como fator de risco para a disseminação do BVDV e associaram o resultado com o manejo de reutilizar luvas de palpação, uma vez que há possibilidade do agente manter-se viável neste material. Houe (1999), por sua vez, destacou a possibilidade da transmissão do BVDV via inseminação artificial. O presente trabalho obteve diferença significativa com relação a análise dessa variável, sendo que nas propriedades que utilizaram esse tipo de manejo apresentaram maior frequência de bovinos soropositivos.

Este trabalho corroborou com a hipótese discutida por Almeida et al. (2013), que apontou que a prática de reutilização da luva de palpação retal poderia estar envolvida na disseminação do BVDV, pois as propriedades que faziam uso desse tipo de manejo apresentaram maior proporção de animais positivos ao vírus.

O compartilhamento de pasto com os vizinhos foi considerado um fator de risco neste estudo. Esse tipo de manejo possibilitou que os bovinos tenham contato com outros animais, incluindo bovinos positivos para BVDV. Outros trabalhos consideraram o compartilhamento de pasto com diferentes rebanhos como um fator de risco para disseminação BVDV (Luzzago et al. 2008, Talafha et al. 2009). Talafha et al. (2009) apontaram também a falta de quarentena na introdução de animais nas propriedades, assim como a visita dos funcionários de outras propriedades como fatores de risco para disseminação do BVDV nos rebanhos analisados.

Características das propriedades e movimentação de bovinos

Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com os obtidos por Talafha et al. (2009) na Jordânia e Mainar-Jaime et al. (2001) na Espanha, os quais observaram que a prevalência de animais soropositivos para o BVDV se elevava a medida que aumentava a lotação dos rebanhos avaliados. Esse fato deve estar relacionado com maior densidade populacional dos rebanhos, o que facilitaria a disseminação viral devido ao maior contato entre os animais.

Contudo, em áreas maiores de 50 hectares a prevalência de bovinos soropositivos para o BVDV foi maior, o que não era esperado, uma vez que, em áreas maiores, acredita-se que o contato entre os animais seja menor. Porém, a alta prevalência pode ser justificada pelo grau elevado de tecnificação das propriedades analisadas que possuíam essa característica de sistema de criação intensivo e emprego de inseminação artificial (com reutilização de luvas de palpação), manejos que podem ter contribuído para a disseminação viral. Resultado semelhante ao do presente estudo foi obtido por Solis-Calderon et al. (2005), no qual maiores prevalências ocorreram em propriedades com área entre 101 e 290 hectares, porém deve-se considerar que o estudo foi realizado em gado de corte em não leiteiro.

Propriedades que apresentaram percentuais de entrada e saída maiores que 10% foram as que obtiveram maior prevalência de bovinos sororreagentes ao BVDV. Não foi encontrado na literatura nenhum outro estudo que avaliou o percentual de entrada e saída de animais da propriedade como possível fator de risco. Porém existem autores que avaliaram a origem dos animais como fator de risco (Solis-Calderon et al. 2005); possibilitando a comparação desses resultados com os obtidos nesse estudo, uma vez que a introdução de um animal positivo na propriedade é suficiente para levar a disseminação do vírus dentro do rebanho. A compra e venda de animais, assim com a ida de animais para exposições pode proporcionar a introdução ou o contato com animais positivos, possibilitando assim a infecção dos animais de propriedades livres. Solis-Calderon et al. (2005) trabalharam com a origem dos animais para reposição dos planteis de bovinos avaliados e constataram que, quando os animais eram originados de outras propriedades, a prevalência de soropositivos dos rebanhos foi maior, ressaltando a importância do controle da movimentação dos bovinos na disseminação do BVDV.

Análise multivariada do modelo de regressão logística para BVDV

Com relação à idade dos animais, verificou-se que os bovinos com idade superior a 48 meses apresentaram 4,4 vezes mais risco de estarem infectados com o vírus BVDV do que os animais mais novos. Isso pode ser justificado pelo fato de que animais mais velhos permanecem expostos ao vírus por um tempo mais prolongado quando comparado aos animais jovens, o que aumenta consideravelmente as chances de se obter animais soropositivos ao teste de VN. Levando em consideração que animais adultos estão em plena fase de reprodução, manejos como palpação retal e inseminação artificial podem levar a disseminação do vírus nos bovinos desta faixa etária.

Quanto ao percentual de entrada de animais a propriedades com taxas superiores a 10% apresentaram 17,5 mais chances de possuir animais soropositivos para o BVDV. Resultado semelhante foi observado por Mainar-Jaime et al. (2001), que relataram que propriedades que

adquiriam fêmeas adultas de outras unidades produtivas apresentavam 3,83 mais chances de encontrar animais sororreagentes ao BVDV em seus rebanhos.

Apesar de parecer controverso, um percentual de saída de animais da propriedade maior que 10% mostrou ser um fator de risco para a contaminação por BVDV. As propriedades com este percentual apresentaram 5,2 mais chances de disseminação dos vírus, quando comparadas a outras propriedades. Isto se deve ao fato de que as propriedades avaliadas neste estudo não eram consideradas “fechadas”, ou seja, aquelas em que não ocorre entrada de outros animais e/ou aquelas em que a reposição do plantel era realizada com animais da própria unidade produtora. Desta forma, a saída de animais das propriedades avaliadas neste estudo se reflete posteriormente na entrada de outros bovinos, possibilitando a circulação do agente na propriedade.

Tendo em vista a possibilidade de transmissão viral por contato direto ou indireto, neste estudo, bovinos de propriedades onde havia o manejo de compartilhamento de pasto apresentavam 9,1 vezes mais chances de apresentarem-se soropositivos frente ao teste de diagnóstico utilizado. Resultados semelhantes foram observados por Luzzago et al. (2008), que constataram que este manejo foi considerado como fator de risco em rebanhos na Itália, aumentando em 1,05 vezes as chances de se obter animais soropositivos. Este tipo de manejo foi quase unanimidade nas propriedades da região Sudoeste do Estado do Paraná (4/5), contribuindo para que os bovinos desta região tivessem 52 vezes mais chances de apresentarem-se soropositivos. Nas demais regiões do Estado do Paraná analisadas neste trabalho, apenas uma das nove propriedades examinadas realizava o manejo de compartilhamento de pasto entre vizinhos, o que pode ter contribuído para considerar as demais regiões como fator de proteção para a disseminação do BVDV nestas propriedades.

Bovinos criados sobre o manejo semi-intensivo apresentaram 1,3 vezes mais chances de serem sororreagentes para BVDV, o que pode ser justificado pelo fato de que nesse tipo de sistema de criação o contato entre os animais é maior (Rebhun 2000). Quando ao sistema extensivo, este foi considerado fator de proteção para disseminação viral, contrariando os achados de Quincozes et al. (2007) e Samara et al. (2004). No sistema extensivo os animais tem menor contato direto, pois permanecem soltos no pasto durante todo o dia. O contato mais próximo dos animais normalmente só ocorre durante a ordenha, dificultado assim a disseminação viral.

O procedimento de não reutilização de luva de palpação retal foi considerado como fator de proteção para disseminação viral. Uma vez que o BVDV pode permanecer viável por dias ou semanas no meio ambiente e em fômites, como luva de palpação retal, agulhas, seringas, instrumentos cirúrgicos (Flores 2007). A utilização de uma única luva por animal é um procedimento simples, e diminui consideravelmente o risco da contaminação com o vírus BVDV dentro dos rebanhos.

Com relação ao número de animais nas propriedades, pode-se dizer que, em unidades produtoras com número de bovinos menor ou igual a 50 animais, os bovinos tem 16,6 vezes mais chances de ter estarem soropositivos para o BVDV. Isto provavelmente ocorreu pois nas propriedades com esta característica houve maior movimentação do rebanho (entrada/saída), facilitando assim o contato com animais positivos e a introdução do agente no rebanho. Esses resultados diferem dos obtidos por Talafha et al. (2009), que observaram quanto maior o número de animais no rebanho, maior foi a prevalência de animais sororreagentes, para estes autores a maior densidade proporcionou maior contato entre os animais e disseminação viral.

No presente estudo, área da propriedade menor ou igual a 25 hectares e de até 50 hectares apresentaram-se como fator de proteção na disseminação do vírus da BVDV nos rebanhos. Isso se deve ao fato de que na maioria dessas propriedades (14/21) não adotaram o compartilhamento de pasto entre vizinhos como manejo, característica que foi considerada um fator de risco importante por favorecer o aumento do número de animais positivos. Cabe ressaltar também que algumas propriedades pertenciam as demais regiões do Estado do Paraná, área esta que foi considerada também como fator protetor nesse estudo.

O BVDV está disseminado nos bovinos leiteiros da raça HPB do estado do Paraná. As medidas de controle sanitário devem ser tomadas para minimizar a disseminação viral entre os rebanhos, evitando assim perdas econômicas para bovinocultura leiteira do estado.

AGRADECIMENTOS

Aos proprietários dos bovinos dos rebanhos do estado do Paraná utilizados neste estudo; ao Instituto Biológico de São Paulo pelo processamento das análises sorológicas; à Profa. Ana Tereza Bittencourt Guimarães pela análise estatística.

REFERÊNCIAS

- Alexandrino B., Dias F.C., Oliveira M.C., Affonso G.T., Pereira G.T. & Samara S.I. 2011. Herpesvirus bovino associado à diarreia viral bovina e à leucose bovina. *Ars Veterinária*, Jaboticabal. 27(3): 168-174.
- Almeida L.L., Miranda I.C.S., Hein H.E., Santiago Neto W., Costa E.F., Marks F.S., Rodenbusch C.R., Canal C.W. & Corbellini L.G. 2013. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Research in Veterinary Science*. 95: 901-907.
- Assis-Brasil N.D., Marcolongo-Pereira C., Hinnah F.L., Ladeira S.R.L., Sallis E.S.V., Grecco F.B. & Schild A.L. 2013. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro. 33(4): 423-430.
- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia. 11: 425-445.
- Bezerra D.C., Chaves N.P., Sousa V.E., Santos H.P. & Pereira H.M. 2012. Fatores de risco associados à infecção pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da região Amazônica maranhense. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo. 79(1): 107-111.
- Biogenesis-Bagó. 2008. *Imunologia - Síndromes e Vacinas*. 2. Ed. Curitiba: Landgraf Editora Ltda. 52p.
- Brito W.M.E.D., Alfaia B.T., Caixeta S.P.M.B., Ribeiro A.C.C., Miranda T.M.T., Barbosa A.C.V.C., Barthasson D.L., Linhares D.C. & Faria B.O. 2002. Serological study on bovine viral diarrhoea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. *Vírus Reviews & Research* 7(1): 144.
- Brito W.M.E.D., Alfaia B.T., Caixeta S.P.M.B., Ribeiro A.C.C., Miranda T.M.T., Barbosa A.C.V.C., Barthasson D.L., Linhares D.C. & Faria B.O. 2010. Prevalência da Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. Goiânia. 39(7): 7-19.
- Chaves P.N., Bezerra D.C., Costa F.B., Sousa V.E., Santos H.P. & Pereira H.M. 2009. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados nas regionais de Bacabal e Pedreiras, estado do Maranhão. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, VIII, 2009, Belo Horizonte, Anais..., Belo Horizonte,
- Chaves N.P., Bezerra D.C., Sousa V.E., Santos H.P. & Pereira H.M. 2010. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria. 40: 1448-1451.
- Chaves N.P., Bezerra D.C., Sousa V.E., Santos H.P. & Pereira H.M. 2012. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em bovinos leiteiros não vacinados no Estado do Maranhão. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo. 79(4): 495-502.
- Castro R.S., Melo L.E.H., Abreu S.R.O., Muniz A.M.M. & Albuquerque A.P.S. 1993. Anticorpos neutralizantes contra pestevírus em soros bovinos do estado de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 28(11): 1327-1331.
- Carbonero A., Saa L.R., Jara D.V., Garcia-Bocanegra I., Arenas A., Borges C. & Perea, A. 2011. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*. 100: 84-88.
- Dias J. A., Alfieri A.A., Médici K.C., Freitas J.C., Neto J.S.F.E. & Müller E.E. 2008. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(3) 161-168.
- Farshid M., Shahriar E.G., Janzen E., West K. & Wobeser G. 2002. Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *The Canadian Veterinary Journal*. 43: 863-868.
- Flores E.F. 2003. Vírus da Diarreia Viral Bovina. *Arq. Inst. Biológico*, São Paulo. 65(1-2): 3-9.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehe P.M., Alfieri A.A. & Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 25: 125-134.
- Flores E.F. 2007. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed. UFMS, p.435-462.
- Finney D.J. 1964. The Spearman-Kärber method. In: _____ *Statistical method in biological assay*. 2nd. ed. London: Charles Griffin & Company, p. 524-531.
- Fransoloso R., Anziliero D., Spagnolo J., Kuse N., Fiori C., Scortegagna G.T., Barcellos L.J.G. & Kreutz L.C. 2008. Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarreia viral bovina, rinotraqueíte

- infecçiosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 9(4): 1102-1106.
- Guimarães P.L.S.N., Chaves N.S.T., Silva L.A.F. & Acypreste C.S. 2000. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em bovinos do entorno de Goiânia, em regime de criação semi-extensivo. *Ciência Animal Brasileira*. 1(2): 137-142.
- Hair J.F. Jr, Black W.C., Babin B.J., Anderson R.E. & Tatham R.L. 2009. *Análise Multivariada de Dados; tradução Adonai Schlup Sant'Anna*. 6ª Ed, Porto Alegre: Bookman. 688 p.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*. 64: 89-107.
- Houe H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*. 31: 137-143.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2010. *Produção da Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro IBGE. 38: 165pp.
- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES). 2008. *Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná*. Curitiba: IPARDES, 187pp.
- Langoni H., Paes A.C., Tonin F.B., Silva A.V. & Denardi M.B. 1995. Prevalence of BVD, IBR and PI 3 in bovine by ELISA test. In: *Anais da Sociedade Brasileira de Virologia, Ribeirão Preto*. n. B43.
- Luzzago C., Frigerio M., Piccinini R., Daprà V. & Zecconi A. 2008. A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy. *The Veterinary Journal*. 177: 236-241.
- Mainar-Jaime R.C., Herranz B.B., Arias P. & Vazquez R. 2001. Epidemiological pattern and risk factors associated with BVDV infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 52: 63-73.
- Martin S.W. & Bohac J.G. 1986. The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine diarrhoea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in Ontario feedlot calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 50(3): 351-358.
- Médici K.C., Moscardi Jr. E., Vicente K., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2000. Identification of antibodies against bovine virus diarrhoea virus, beef and dairy cattle herds in Paraná State. *Virus Review and Research*. 5(1): 145.
- Mosier D.A. 1997. Bacterial Pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 13 (3): 483-493.
- National Agricultural Statistics Service (NASS) 2006. *Agricultural Statistics Annual*. Disponível em <<http://nass.usda.gov/>>. Acesso em: 12/03/2014.
- Oliveira M.C., Alexandrino B., Borges L.A., Medeiros A.S.R., Affonso I.B., Dias F.C. & Samara S.I. 2012. Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em vacas gestantes abatidas. *Medicina Veterinária, Recife*. 6(2): 10-17.
- Pacheco J.M.C. 2010. *Caracterização do perfil de risco e avaliação de práticas de biossegurança em explorações produtoras de leite*. 45p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto.
- Pereira D.F., Oliveira S.C. & Penha N.L.J. 2011. Logistic regression to estimate the welfare of broiler breeders in relation to environmental and behavioral variables. *Engenharia Agrícola, Jaboticabal*. 31(1): 33-40.
- Pituco E.M. & Del Fava C. 1998. Situação do BVDV na América do Sul. *Anais do Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)*, Santa Maria, RS. Laboratório de Virologia, UFSM, p.49-57.
- Pituco E.M. 2014. *Comunicação pessoal (Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico de São Paulo*. E-mail: pituco@biologico.sp.gov.br).
- Quincozes C.G., Fischer G., Hubner S.O., Vargas G.D'Avila, Vidor T. & Brod C.S. 2007. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*. 28(2): 269-276.
- Ramsey F.K. & Chivers W.H. 1956. Mucosal disease of cattle. *North American Veterinarian*. 34: 629-633.
- Rebhun W.C. 2000. *Doenças do Gado Leiteiro*. São Paulo: Editora Roca. 462p.
- Reed L.J. & Muench H.A.A. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *The American Journal of Hygiene, Baltimore*. 27: 493-497.
- Ribeiro M.B., Galvão C.L., Costa A.R., Rodrigues F.M. & Suzart J.C.C. 1987. Infecções pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa, diarreia viral bovina e

- parainfluenza 3, detectados por meio de avaliação sorológica no Estado da Bahia. Salvador, EMBRAPA (Boletim técnico, n.11).
- Richtzeinhain L.J. 1997. Em busca de respostas. Revista Criadores, n. 808, p. 40.
- Samara S.I., Dias F.C. & Moreira S.P.G. 2004. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 41: 369-403.
- Sarrazin S., Veldhuis A., Méroc E., Vangeel I., Laureyns J., Dewulf J., Caij A.B., Piepers S., Hooyberghs J., Ribbens S. & Van Der Stede Y. 2013. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 108: 28-37.
- Snedecor G.W. & Cochran W.G. 1980. *Statistical Methods*, 7.ed. Ames: Iowa State University Press, pp.210.
- Snowder G.D., Van Vleck L.D., Cundiff L.V. & Bennett G.L. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *Journal of Animal Science*. 84: 1999-2008.
- Solis-Calderon J.J., Segura-Correa V.M. & Segura-Correa J.C. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*. 72: 253-262.
- Solis-Calderon J.J., Segura-Correa J.C., Aguilar-Romero F. & Segura-Correa V.M. 2007. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam 82: 102-107.
- Sousa V.E., Chaves N.P., Bezerra D.C., Santos H.P. & Pereira H.M. 2008. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da ilha de São Luís-MA. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35, 2008, Gramado. Anais... Gramado.
- Sousa V.E., Chaves N.P., Bezerra D.C., Santos H.P. & Pereira H.M. 2009. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da ilha de São Luís-MA. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, VIII, Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1.
- Talafha A.Q., Hirche S.M., Ababneh M.M., Al-Majali A.M. & Ababneh M.M. 2009. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. *Tropical Animal Health and Production*. 41: 499-506.
- Thompson J.A., Gonçalves V.S.P., Leite R.C., Bandeira D.A. & Miranda R.H.L. 2006. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 76: 290-301.
- Tizard, I.R. 2012. *Veterinary Immunology*. Philadelphia:W.B.Saunders. p.568.
- Valarcher J.F. & Hägglund S. 2006. Viral respiratory infections in cattle. In: World Buiatrics Congress, 24., Nice. 2006, France. Proceedings.... Nice, France.
- World Organization for Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2013. Disponível em <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/> Acesso em: 13/04/2014.

Legendas das Figuras

- Fig.1. Localização geográfica dos municípios participantes da pesquisa dentro do Estado do Paraná.
- Fig.2. Curva ROC demonstrativa da especificidade e sensibilidade do modelo de regressão logística elaborado para o BVDV.

Os Quadros

Quadro 1. Distribuição da coleta das amostras por região amostral e por município coletado

Regiões	Municípios	Número de propriedades coletadas por município	Número de amostras coletadas por município
Sudoeste	Francisco Beltrão	2	27
	Marmeleiro	1	50
	Renascença	2	25
Oeste	Cascavel	2	39
	Terra Roxa	2	27
Centro-Oriental	Carambeí	2	63
	Palmeira	2	116
	Ponta Grossa	1	38
Demais Regiões	Piraf do Sul	3	112
	Bandeirantes	1	11
	Campina Grande do Sul	1	36
	Icaraíma	1	8
	Iporã	1	31
	Mangueirinha	1	27
	Pinhais	1	40
	Santo Antônio da Platina	2	38
Teixeira Soares	1	26	
TOTAL	17	26	714

Quadro 2. Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme os sistemas de produção

Sistema de Produção	Nº de animais	Nº de soropositivos	Prevalência (%)
Extensivo	86	13	15,11 ^a
Semi-Intensivo	527	158	30,00 ^b
Intensivo	101	85	84,15 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Quadro 3. Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme a idade dos bovinos estudados

Idade (meses)	Nº de animais	Nº de soropositivos	Prevalência (%)
7 a 24	239	67	28,03 ^a
25 a 48	190	78	41,05 ^b
>48	285	111	38,94 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Quadro 4. Prevalência de bovinos sororreagentes ao BVDV conforme o manejo

Tipo de Manejo		Nº de animais	Nº de animais Sororreagentes	Prevalência (%)
Inseminação artificial	Sim	664	247	37,29 ^a
	Não	50	9	18,00 ^b
Reutilização de luva de palpação	Sim	584	248	42,46 ^a
	Não	130	8	6,15 ^b
Compartilhamento de pasto com vizinhos	Sim	187	81	43,31 ^a
	Não	527	175	33,20 ^b

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

Quadro 5. Prevalência dos bovinos sororreagentes ao BVDV conforme as características das propriedades e a movimentação de animais

Variáveis		Nº de animais	Nº de animais Sororreagentes	Prevalência (%)
Número de animais da propriedade	≤ 50	83	17	20,48 ^a
	51 a 100	459	115	25,05 ^b
	>100	172	124	72,09 ^c
Área da propriedade (hectares)	≤25	287	90	31,36 ^a
	26 a 50	323	77	23,62 ^b
	>50	104	89	63,57 ^c
Percentual de entrada de animais	≤5%	360	99	25,00 ^a
	6% a 10%	158	47	29,75 ^b
	>10%	196	110	56,12 ^c
Percentual de saída de animais	≤5%	63	5	7,93 ^a
	6% a 10%	74	19	25,67 ^b
	>10%	577	232	40,20 ^c

Variáveis seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Quadro 6. Coeficientes (valor) e Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão logística para o BVDV

Variáveis	Valor	Erro Padrão	Pr > Qui ²	OR (IC95%)	
Intercepto	0,333	0,379	0,379		
Regiões do Estado do Paraná	Centro Oriental	0,000	0,000		
	Oeste	-1,140	0,691	0,099	0,320 (0,083 - 1,240)
	Demais Regiões	-1,979	0,437	< 0,0001	0,138 (0,059 - 0,325)
	Sudoeste	3,959	1,238	0,001	52,388 (4,629 - 592,873)
Sistema de produção	Intensivo	0,000	0,000		
	Semi-intensivo	0,288	0,832	0,730	1,333 (0,261 - 6,815)
	Extensivo	-5,809	1,523	0,000	0,003 (0,000 - 0,059)
Número de animais da propriedade	>100	0,000	0,000		
	51 a 100	2,069	0,763	0,007	7,915 (1,776 - 35,280)
	≤ 50	2,814	0,840	0,001	16,682 (3,218 - 86,481)
Área da propriedade (hectares)	>50	0,000	0,000		
	≤25	-4,947	0,981	< 0,0001	0,007 (0,001 - 0,049)
	26 a 50	-4,745	0,661	< 0,0001	0,009 (0,002 - 0,032)
Idade (meses)	7 a ≤24	0,000	0,000		
	25 a 48	1,145	0,319	0,000	3,144 (1,684 - 5,869)
	>48	1,483	0,298	< 0,0001	4,407 (2,456 - 7,906)
Percentual de entrada de animais	6% a 10%	0,000	0,000		
	>10%	2,866	0,426	< 0,0001	17,560 (7,613 - 40,506)
	≤5%	0,064	0,618	0,917	1,066 (0,317 - 3,583)
Percentual de saída de animais	6% a 10%	0,000	0,000		
	>10%	1,661	0,785	0,034	5,266 (1,131 - 24,507)
	≤5%	-1,783	0,865	0,039	0,168 (3,751 - 22,310)
Reutilização luva de palpação	Sim	0,000	0,000		
	Não	-2,237	0,583	0,000	0,107 (0,034 - 0,334)
Compartilhamento de pasto com vizinhos	Não	0,000	0,000		
	Sim	2,214	0,455	< 0,0001	9,148 (3,751 - 22,310)

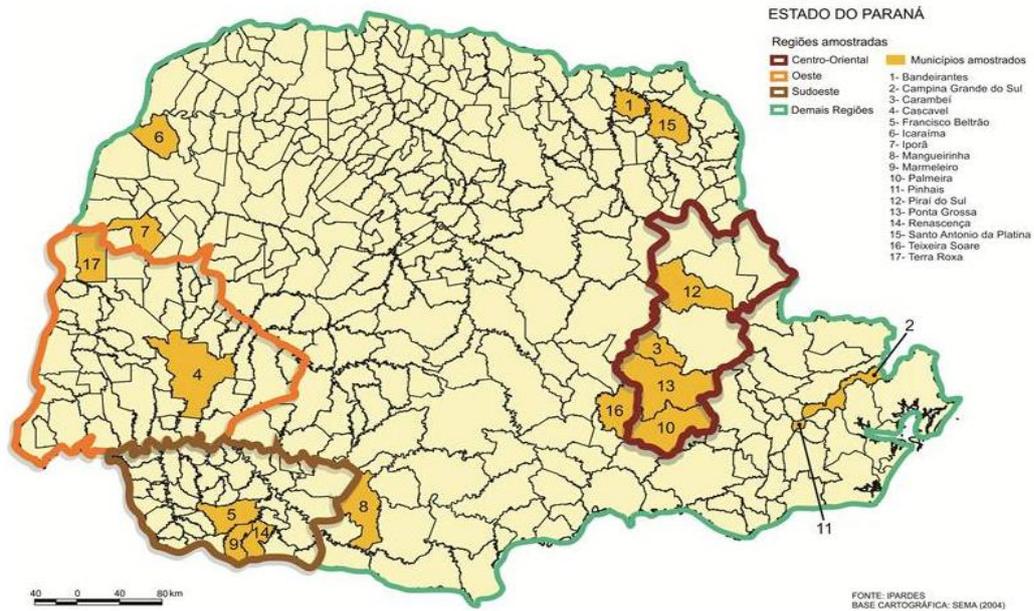


Figura 1.

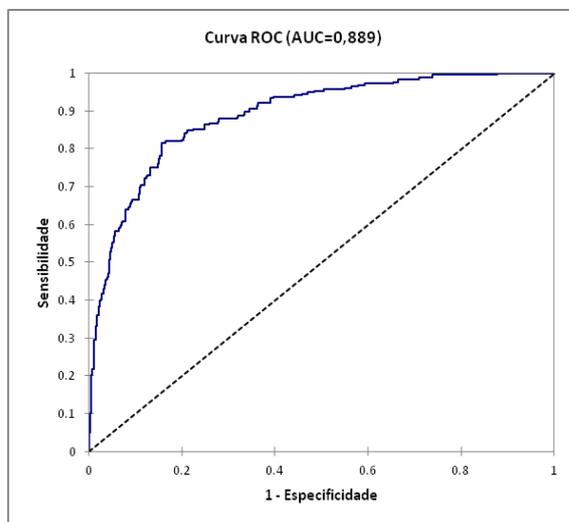
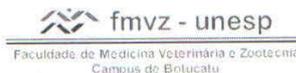


Figura 2.

ANEXOS**ANEXO I - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****A T E S T A D O**

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Levantamento sorológico de doenças respiratórias virais, em bovinos da raça Holandesa Preta e Branca, criados no Estado do Paraná"** Protocolo nº 220/2012-CEUA, de **Daniella Sponchiado**, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Doutorado, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 14 de dezembro de 2012.

Prof.ª Ass. Dr.ª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO II – QUESTIONÁRIO

Questionário epidemiológico aplicado durante as visitas às propriedades utilizadas no projeto de pesquisa de **“Prevalência dos principais vírus respiratórios em bovinos da raça holandesa, no Estado do Paraná”**

1. IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE

Nº _____ Nome: _____

Proprietário: _____ Telefone: _____

Município: _____

Região do estado: () Sudoeste () Oeste () Centro-Oriental () Demais regiões

2. QUAL O SISTEMA DE PRODUÇÃO?

() Extensiva () Semi-intensiva () Intensiva

3. NÚMERO DE ANIMAIS?

() ≤50 () 51 a 100 () >100

4. NÚMERO DE ANIMAIS?

() ≤50 () 51 a 100 () >100

5. ÁREA EM HECTARES?

() ≤25 () 26 a 50 () >50

6. LOTAÇÃO DE BOVINOS POR HECTARE?

() ≤2 () 3 () >3

7. REALIZA MONTA NATURAL?

() Sim () Não

OBS: _____

8. UTILIZA TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL?

() Sim () Não

OBS: _____

9. REUTILIZA LUVA DE PALPAÇÃO?

() Sim () Não

OBS: _____

10. REUTILIZA AGULHAS E SERINGAS?

() Sim () Não

OBS: _____

11. PARTICIPA DE FEIRAS OU EXPOSIÇÕES?

() Sim () Não

OBS: _____

12. COMPARTILHA PASTO COM VIZINHOS?

() Sim () Não

13. OBS: _____

_____ QUAL PERCENTUAL DE ENTRADA DE BOVINOS NA
PROPRIEDADE? (NOS ÚLTIMOS 6 MESES)

Número absoluto: _____

() ≤5% () 6 a 10% () >10%

14. QUAL PERCENTUAL DE SAÍDA DOS BOVINOS DA PROPRIEDADE?
(NOS ÚLTIMOS 6 MESES)

Número absoluto: _____

() ≤5% () 6 a 10% () >10%

OBS: Perguntas 12 e 13 fazer regra de três para obter a resposta em percentual. Ex: se a propriedade tem 100 bovinos e nos últimos 6 meses entraram 10 animais, então ocorreu 10% de entrada de bovinos nessa propriedade.

ANEXO III – Prevalência do Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Vírus da Parainfluenza-3 Bovina tipo 3 (bPIV-3) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) em bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca de propriedades da região Sudoeste do Paraná.

<i>Município</i>	<i>Propriedade</i>	<i>Nº Amostras coletadas</i>	<i>BoHV-1</i>			<i>BVDV</i>			<i>BPI3</i>			<i>BRSV</i>		
			<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título* (Min/Max)</i>	<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título* (Min/Max)</i>	<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título (Min/Max)</i>	<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título (Min/Max)</i>
<i>Francisco Beltão</i>	<i>1</i>	8	1	12,5	4	0	0	-	0	0	-	5	62,5	4 - 32
	<i>2</i>	19	11	57,9	16 - 256	7	36,8	10 - 2560	19	100,0	32 - 1024	18	94,7	2 - 128
<i>Marmeleiro</i>	<i>3</i>	50	1	2,0	4	3	6,0	20 - 320	38	76,0	4 - 1024	44	88,0	4 - 256
<i>Renascença</i>	<i>4</i>	16	8	50,0	4 - 512	10	62,5	80 - 5120	16	100,0	256 - 1024	15	93,7	2 - 1024
	<i>5</i>	9	0	0	-	3	33,3	320 - 640	9	100,0	16 - 1024	9	100,0	2 - 32
<i>Total</i>		102	21	20,6	4 - 512	23	22,5	10 - 5120	82	80,4	4-1024	91	89,2	2 - 1024

*Título expresso como o inverso da diluição
Min - mínimo; Max - máximo

ANEXO IV – Prevalência do Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Vírus da Parainfluenza-3 Bovina tipo 3 (Bpiv-3) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) em bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca de propriedades da região Oeste do Paraná

<i>Município</i>	<i>Propriedade</i>	<i>Nº Amostras coletadas</i>	<i>BoHV-1</i>			<i>BVDV</i>			<i>Bpi3</i>			<i>BRSV</i>		
			<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título* (Min/Max)</i>	<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título* (Min/Max)</i>	<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título (Min/Max)</i>	<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título (Min/Max)</i>
<i>Terra Roxa</i>	<i>6</i>	14	0	0	-	0	0	-	4	28,6	64 – 512	14	100,0	2 – 16
	<i>7</i>	13	3	23,1	32 – 64	1	7,7	40	13	100,0	16 -1024	13	100,0	4 – 64
<i>Cascavel</i>	<i>8</i>	10	7	70,0	64 – 512	1	10,0	5120	7	70,0	2 – 128	10	100,0	8 – 512
	<i>9</i>	29	27	93,1	16 – 1024	22	75,9	10 – 5120	29	100,0	4 – 1024	28	98,8	4 – 1024
<i>Total</i>		66	37	56,1	16 – 1024	24	36,4	10 – 5120	53	80,3	2 – 1024	65	98,5	2 – 1024

* Título expresso como o inverso da diluição; Min – mínimo; Max – máximo

ANEXO V – Prevalência do Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Vírus da Parainfluenza-3 Bovina tipo 3 (bPIV-3) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) em bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca de propriedades da região Centro Oriental do Paraná

<i>Município</i>	<i>Propriedade</i>	<i>Nº Amostras coletas</i>	<i>BoHV-1</i>			<i>BVDV</i>			<i>bPI3</i>			<i>BRSV</i>		
			<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título* (Min/Max)</i>									
<i>Carambeí</i>	10	39	2	5,1	64 - 128	28	71,8	20 - 5120	39	100,0	4 - 1024	39	100,0	4 - 1024
	11	24	0	0	-	23	95,8	40 - 5120	20	83,3	2 - 1024	23	95,8	2 - 256
<i>Palmeira</i>	12	72	38	52,7	2 - 1024	20	27,8	20 - 2560	41	56,9	4 - 1024	71	98,6	2 - 1024
	13	44	1	2,3	1024	1	2,3	1280	35	79,5	2 - 512	41	93,2	2 - 64
<i>Piraí do Sul</i>	14	33	0	0	-	31	93,9	40 - 5120	27	81,8	16 - 1024	33	100,0	2 - 64
	15	29	0	0	-	11	37,9	10 - 5120	29	100,0	4 - 1024	26	89,6	2 - 256
	16	50	0	0	-	8	16,0	20 - 2560	42	84,0	4 - 1024	45	90,0	2 - 512
<i>Ponta Grossa</i>	17	38	18	47,4	8 - 1024	34	89,8	80 - 5120	37	97,4	32 - 1024	38	100,0	4 - 1024
Total		329	59	17,9	2 - 1024	156	47,4	10 - 5120	270	82,1	2 - 1024	316	96,0	2 - 1024

* Título expresso como o inverso da diluição; Min - mínimo; Max - máximo

ANEXO VI – Prevalência do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Vírus da Parainfluenza-3 Bovina tipo 3 (bPIV-3) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) em bovinos da raça Holandesa variedade Preta e Branca de propriedades das Demais Regiões do Paraná

<i>Município</i>	<i>Propriedade</i>	<i>Nº Amostras Coletadas</i>	<i>BoHV-1</i>			<i>BVDV</i>			<i>bPI3</i>			<i>BRSV</i>		
			<i>Amostras Positivas</i>	<i>%</i>	<i>Título* (Min/Max)</i>									
<i>Icaraíma</i>	18	8	0	0	-	7	87,5	80 - 5120	8	100,0	64 - 1024	8	100,0	2 - 1024
<i>Pinhais</i>	19	40	0	0	-	3	7,5	20 - 160	25	62,5	8 - 1024	35	87,5	2 - 128
<i>Bandeirantes</i>	20	11	10	90,9	4 - 128	10	90,9	40 - 5120	11	100,0	128 - 1024	11	100,0	8 - 512
<i>Santo Antonio da Platina</i>	21	22	7	31,8	8 - 512	12	54,5	40 - 2560	22	100,0	32 - 1024	20	90,0	2 - 512
	22	16	13	81,2	2 - 256	9	56,2	80 - 5120	15	93,7	2 - 1024	16	100,0	8 - 1024
<i>Teixeira Soares</i>	23	26	0	0	-	5	19,2	640 - 5120	25	96,1	64 - 1024	19	73,0	2 - 128
<i>Mangueirinha</i>	24	27	1	3,7	64	5	18,5	80 - 2560	26	96,3	64 - 1024	25	92,6	2 - 256
<i>Campinha Grande do Sul</i>	25	36	9	25,0	32 - 1024	0	0	-	9	25,0	4 - 1024	31	86,1	2 - 64
<i>Iporã</i>	26	31	2	6,4	8 - 16	2	6,4	80	28	90,3	2 - 1024	31	100,0	2 - 256
Total		217	42	19,4	2 - 1024	53	24,4	20 - 5120	169	77,8	2 - 1024	196	90,3	2 - 1024

* Título expresso como o inverso da diluição; Min - mínimo; Max - máximo

ANEXO VII – Distribuição das amostras sororreagentes ao teste de diagnóstico de virusneutralização conforme a variação dos títulos de anticorpos contra Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em bovinos de propriedades das regiões Sudoeste, Oeste, Centro Oriental e Demais Regiões do Estado do Paraná.

Vírus	Títulos de Anticorpos*	Propriedades da Região Sudoeste					Propriedades da Região Oeste				Propriedades da Região Centro Oriental							Propriedades de Demais Regiões									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
BoHV-1 ^a	2 - 8	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	7	0	0	5	3	9	0	0	0	1
	16 - 64	0	6	0	2	0	0	3	1	10	1	0	11	0	0	0	0	9	0	0	4	3	2	0	1	2	1
	128 - 512	0	5	0	5	0	0	0	6	13	1	0	16	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	0	0	6	0
	≥1024	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
BVDV ^b	10 - 40	0	4	1	0	0	0	1	0	3	5	1	4	0	2	2	1	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0
	80 - 320	0	2	2	4	1	0	0	0	8	12	4	9	0	14	4	2	2	4	1	0	7	4	0	1	0	2
	640 - 1280	0	0	0	3	2	0	0	0	5	5	9	6	1	9	2	4	4	1	0	4	2	1	1	2	0	0
	≥ 2560	0	1	0	3	0	0	0	1	6	6	9	1	0	6	3	1	28	2	0	5	1	4	4	2	0	0

* Título expresso como o inverso da diluição

^aBoHV-1: não reagente < 2

^bBVDV: não reagente < 10

ANEXO VIII – Distribuição das amostras sororreagentes ao teste de diagnóstico de Virusneutralização conforme a variação dos títulos de anticorpos contra os vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3 (Bpiv-3) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) em bovinos de propriedades da Região Sudoeste, Oeste, Centro Oriental e Demais Regiões do Estado do Paraná.

Vírus	Títulos de Anticorpos*	Propriedades da Região Sudoeste					Propriedades da Região Oeste				Propriedades da Região Centro Oriental						Propriedades de Demais Regiões										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Bpiv^a	2 – 8	0	0	6	0	0	0	0	5	3	2	1	4	8	0	1	2	0	0	2	0	0	1	0	0	3	3
	16 – 64	0	3	4	0	1	2	8	1	4	11	11	21	13	4	2	7	3	2	7	0	3	1	3	3	2	7
	128 – 512	0	12	18	5	6	2	4	1	13	19	7	15	14	14	12	18	15	5	11	4	17	7	15	11	1	16
	≥1024	0	4	10	11	2	0	1	0	9	7	1	1	0	9	14	15	19	1	5	7	2	6	7	12	3	2
BRSV^b	2 – 8	4	7	14	8	5	13	8	2	9	9	11	29	35	23	8	17	6	5	19	2	6	3	8	19	25	14
	16 – 64	1	10	26	3	4	1	5	6	13	23	10	20	6	10	15	22	22	2	14	5	7	5	9	5	6	15
	128 – 512	0	1	4	0	0	0	0	2	5	6	2	17	0	0	3	6	8	1	2	4	7	8	2	1	0	2
	≥1024	0	0	0	4	0	0	0	0	1	1	0	5	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0

* Título expresso como o inverso da diluição

^a Bpiv-3: não reagente < 2

^b BRSV: não reagente < 2

ANEXO IX – Resultado do questionário aplicado nas 26 propriedades estudadas dividido em regiões e municípios do Estado do Paraná

Regiões	Municípios	Propriedade	Sistema de produção	Número de bovinos na propriedade	Área da propriedade (ha)	Lotação (bovinos/ha)	Reutilização de lúvas	Reutilização de agulhas e seringas	Monta natural	Inseminação artificial	Participação em feiras	Compartilha pasto com vizinhos	Percentual de Entrada de animais	Percentual de Sarda de animais
Sudoeste	Francisco Belão	1	E	≤50	≤25	≤2	S	S	S	S	N	S	≤5%	>10%
		2	E	51 a 100	26 a 50	≤2	S	S	S	N	N	S	≤5%	>10%
	Marmeleiro	3	E	51 a 100	26 a 50	≤2	N	S	S	S	S	S	6% a 10%	>10%
	Renascença	4	SI	>100	≤25	>3	S	N	N	S	N	N	≤5%	>10%
		5	E	51 a 100	≤25	3	N	N	N	S	S	S	>10%	>10%
Oeste	Terra Roxa	6	SI	≤50	≤25	≤2	N	S	N	S	N	N	6% a 10%	>10%
		7	SI	≤50	≤25	≤2	N	S	N	S	N	N	≤5%	6% a 10%
	Cascavel	8	SI	≤50	26 a 50	≤2	S	S	S	S	N	N	≤5%	>10%
Centro Oriental	Carambeí	9	SI	>100	≤25	>3	S	S	S	S	N	S	>10%	>10%
		10	I	>100	>50	-	S	S	N	S	S	N	6% a 10%	>10%
		11	I	51 a 100	>50	-	S	S	N	S	S	N	>10%	>10%
	Palmeira	12	SI	51 a 100	26 a 50	≤2	S	S	S	S	N	N	≤5%	>10%
		13	SI	51 a 100	26 a 50	≤2	N	S	S	S	N	N	≤5%	>10%
	Piraí do Sul	14	SI	51 a 100	>50	≤2	S	S	S	S	N	N	≤5%	>10%
		15	SI	51 a 100	≤25	≤2	S	S	S	S	N	N	6% a 10%	>10%
16	SI	>100	26 a 50	3	S	S	S	S	S	N	N	≤5%	6% a 10%	
Demais regiões	Ponta Grossa	17	I	>100	26 a 50	-	S	S	N	S	S	S	>10%	>10%
	Icaraíma	18	SI	>100	>50	≤2	S	S	S	S	S	S	≤5%	>10%
	Pinhais	19	SI	51 a 100	26 a 50	>3	S	S	S	S	S	N	≤5%	>10%
	Bandeirantes	20	SI	≤50	≤25	>3	S	S	S	S	N	N	≤5%	6% a 10%
	Santo Antonio da Platina	21	SI	51 a 100	≤25	>3	S	S	S	S	S	N	>10%	>10%
		22	SI	51 a 100	≤25	>3	S	S	S	S	N	N	>10%	>10%
	Teixeira Soares	23	SI	51 a 100	≤25	>3	S	S	N	S	N	S	6% a 10%	>10%
	Mangueirinha	24	SI	≤50	≤25	3	S	S	N	S	N	N	>10%	≤5%
	Campinha Grande do Sul	25	SI	51 a 100	≤25	>3	S	S	S	S	N	N	≤5%	≤5%
	Iporã	26	SI	51 a 100	≤25	>3	S	S	S	N	N	N	>10%	>10%

E=Extensivo; SI= Semi-Intensivo; I=Intensivo; S=Sim; N=Não; ha=hectare