

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

**DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVD):
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PERSISTENTE,
AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA RESPOSTA IMUNE E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS**

Fabio Carvalho Dias

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro - 2008

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

**DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVD):
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PERSISTENTE,
AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA RESPOSTA IMUNE E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS**

Fabio Carvalho Dias

Orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro - 2008

D541d Dias, Fabio Carvalho
Diarréia Viral Bovina (BVD): Aspectos epidemiológicos da infecção persistente, avaliação sorológica da resposta imune e caracterização molecular do vírus / Fabio Carvalho Dias. – – Jaboticabal, 2008
xxii, 157 f. :il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Samir Issa Samara

Banca examinadora: Cláudia Del Fava, Amauri Alcindo Alfieri, Adolorata Aparecida Bianco de Carvalho, Aramis Augusto Pinto
Bibliografia

1. Análise filogenética. 2. Animal persistentemente infectado.
3. Anticorpos neutralizantes. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: fabiocadi@yahoo.com.br



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

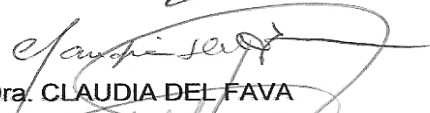
TÍTULO: DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVD) : ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PERSISTENTE, AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA RESPOSTA IMUNE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS

AUTOR: **FABIO CARVALHO DIAS**

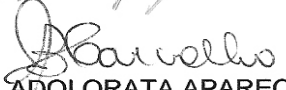
ORIENTADOR: **Dr. SAMIR ISSA SAMARA**

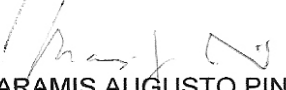
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


Dr. SAMIR ISSA SAMARA


Dra. CLAUDIA DEL FAVA


Dr. AMAURI ALCINDO ALFIERI


Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO


Dr. ARAMIS AUGUSTO PINTO

Data da realização: 12 de fevereiro de 2008.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. SAMIR ISSA SAMARA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FABIO CARVALHO DIAS – nascido em 30 de junho de 1972, no Município de Machado, região Sul do Estado de Minas Gerais, filho de Lindolfo de Souza Dias Neto e Inelma Carvalho Dias. Ingressou em março de 1990 no Curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP-Jaboticabal), concluindo-o em dezembro de 1994. Atuou profissionalmente tanto como autônomo quanto conveniado às Cooperativas Agrárias dos Municípios de Machado e Poço Fundo, Estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 1995 a fevereiro de 1999, exercendo atividades junto aos setores de produção animal. Em março de 1999, iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV-UNESP-Jaboticabal, concluindo-o em setembro de 2001. Após aprovação em concurso público, atuou no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Representação Regional de Passos/MG), de fevereiro de 2001 a fevereiro de 2002, como Médico Veterinário (inspeção) em abatedouro de aves, e também como responsável pela análise e aprovação de registros de rotulagem da área de laticínios. Entre os meses de março de 2002 e fevereiro de 2004, atuou profissionalmente tanto como autônomo quanto conveniado às Cooperativas Agrárias dos Municípios de Machado e Poço Fundo/MG, exercendo atividades junto aos setores de produção animal. Realizou o Curso de Especialização em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado, no período de abril de 2002 a abril de 2003, e o Curso de Especialização em Morfofisiologia Animal, de setembro de 2004 a março de 2006, ambos na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Ingressou em março de 2004 no Curso de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV-UNESP-Jaboticabal, concluindo-o em fevereiro de 2008. Iniciou, em julho de 2007, o Curso de Graduação em Formação Pedagógica para Docentes pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba/MG (CEFET-RP).

***“DEUS PROVÊ, DEUS PROVERÁ,
A SUA MISERICÓRDIA NÃO FALTARÁ”***

Divina Providência



***“Ó MARIA CONCEBIDA SEM PECADO,
ROGAI POR NÓS QUE RECORREMOS A VÓS”***

Nossa Senhora das Graças

AOS MEU PAIS, INELMA E LINDOLFO;

AOS MEUS IRMÃOS, EDUARDO, MYRNA E ÉRIKA;

ÀS MINHAS SOBRINHAS, LAURA, CLARA E PAULA;

DEDICO

***“A família é a base da sociedade e o lugar onde as pessoas aprendem
pela primeira vez os valores que lhes guiam durante toda a sua vida”***

Papa João Paulo II

AGRADECIMENTOS

- A Deus, na Sua Trindade Santa, Pai, Filho e Espírito Santo: “A minha vida sempre esteve nas mãos de Deus”;
- À Maria Santíssima, Mãe de Deus e nossa Mãe, por sempre estar à minha frente, abrindo os caminhos e protegendo-me com seu manto sagrado;
- À minha família, a maior riqueza de minha vida, que sempre me apoiou, estimulou, incentivou e participou do aprimoramento de minha formação profissional;
- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, pelo acolhimento e formação, na graduação, no mestrado e no doutorado;
- Ao Prof. Dr. Samir Issa Samara, pela oportunidade, confiança e credibilidade em sua orientação e, sobretudo, pelo presente da linha de pesquisa a mim confiada;
- À Andréa Souza Ramos de Medeiros, pela amizade, empenho profissional, convivência e, principalmente, por seu fundamental auxílio nos primeiros ensinamentos do cultivo celular e na execução das reações de virusneutralização;
- À Prof^a. Dr^a. Adolorata Aparecida Bianco de Carvalho, por sua grande amizade, confiança, por seu exemplo de ser humano, de professora, de educadora, e também por sua participação e contribuição nas bancas de qualificação e defesa;
- À Cláudia Angelotti, à Maria Imaculada Fonseca e à Nilce Soares, pela presença amiga verdadeira, constante e incondicional;
- Ao Prof. Dr. Luis Antônio Mathias, pelo exemplo profissional, disponibilidade e auxílio em tantos momentos, pela participação e contribuição na banca de qualificação;
- À Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Buzinaro, pela amizade, convivência, participação e contribuição na banca de qualificação;
- Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Prata, pela atenção, disponibilidade e conselhos;
- À Maria Aparecida Dias Tostes, pela amizade e bons momentos de convivência;
- Aos demais docentes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV-UNESP, Prof. Dr. Adjair Antônio do Nascimento, Prof. Dr. Raul José Silva

Gírio, Prof. Dr. Antônio Nader Filho, Prof. Dr. Osvaldo Durival Rossi, Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral e Prof^a. Dr^a. Ângela Banzatto de Carvalho, pela acolhida e participação de minha formação profissional;

- Aos demais técnicos e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV-UNESP, Milton de Souza Siqueira, Nivaldo Assis, José Tebaldi, Mariza Bonafim, Liliana Biondi, Valdemar Dibelli, Hermes Ascari, Adelina Barbeta e Rosiane Cândido, que me acolheram com atenção, respeito e amizade;
- À Dr^a. Cláudia Del Fava, pela amizade, constante apoio, principalmente na ocasião do treinamento no Laboratório de Víruses de Bovídeos do Instituto Biológico, por sua participação e contribuição na banca de defesa;
- Ao Prof. Dr. Amauri Alfieri, pela confiança e acolhida no Laboratório de Virologia Animal da UEL para a execução das reações de RT-PCR, pela participação e contribuição na banca de defesa;
- Ao Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, da Universidade Federal de Santa Maria, por gentilmente ter cedido as estirpes do BVDV 1 e do BVDV 2 para a execução das reações de virusneutralização;
- Ao Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, pela participação e contribuição na banca de qualificação, e ao Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto, pela participação e contribuição na banca de defesa;
- À Kerlei Cristina Médici, pela amizade, por seu apoio em vários momentos e fundamental auxílio na execução das reações de RT-PCR;
- À Dalíria do Prado e à Maria Yoshikawa, pela amizade, disponibilidade e auxílio durante o período de atividades no Laboratório de Virologia Animal em Londrina;
- À Bruna Alexandrino e a Ricardo Moro, pela amizade e auxílio, respectivamente, na execução das reações de virusneutralização e na análise filogenética das estirpes do BVDV;
- Às pesquisadoras Dr^a. Edviges Maristela Pituco, Dr^a. Líria Hiromi Okuda e Dr^a. Eliana de Stefano, e também aos técnicos do Laboratório de Víruses de Bovídeos do Instituto Biológico/SP, pelo apoio em vários momentos e pela acolhida durante o período de treinamento;

- Aos amigos Cláudia Minazaki, Ricardo Jordão, Cláudia Pestana, Moacir Marchiori Filho e Sandra Gatti, pelo auxílio em diversos momentos na execução da tese;
- À Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri, aos pós-graduandos e aos estagiários do Laboratório de Virologia Animal da UEL, pela atenção, apoio e acolhida;
- Aos amigos, Luís Guilherme de Oliveira, Fagner Freitas, Katyane Sousa, Josir Laine Veschi, Fernanda Rezende, Viviane Souza, Thaís Martineli, Darci Nociti, Mônica Costa, pela verdadeira amizade cultivada;
- Aos demais colegas de pós-graduação, pelos bons momentos de convívio;
- A todos os proprietários dos rebanhos bovinos trabalhados nesta tese, em especial, à Médica Veterinária Rosália Maciel de Souza Cipriani, Edmilson Cipriani e Ely Brentini;
- Aos amigos Pe. Paulo Mazzi, Pe. Paulo Alexandre e toda Paróquia de Santa Tereza, uma grande família, na qual tive a benção de participar da Comunidade como Ministro da Sagrada Comunhão;
- Aos funcionários da Biblioteca, em especial, Tieko Sugahara, Neli Saccani e Mabel Custódio, e aos funcionários do Restaurante Universitário, em especial, Nilda Santanna, Mari Helena Zaccharias e Nancy Rossi, pela amizade, atenção e privilégios;
- À Seção de Pós-Graduação, em especial, Karina Severo e Isabel Businaro, pela atenção e disponibilidade;
- À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Projeto financiado pela FAPESP:

Bolsa de doutorado - processo 04/06800-0

Auxílio Pesquisa - processo 06/59757-0

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xx
SUMMARY.....	xxii
 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	 1
1.1 Aspectos gerais da epidemiologia da diarreia viral bovina.....	3
1.2 Manifestações clínicas da diarreia viral bovina.....	8
1.3 Referências.....	14
 CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA OS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV 1 E BVDV 2) EM REBANHOS BOVINOS NOS ESTADOS DE MINAS GERAIS E SÃO PAULO.....	 21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Revisão de literatura.....	23
2.3 Objetivo.....	26
2.4 Material e métodos.....	27
2.4.1 Rebanhos.....	27
2.4.2 Amostragem.....	27
2.4.3 Teste de virusneutralização – VN.....	28
2.4.3.1 Manutenção das culturas celulares.....	29
2.4.3.2 Multiplicação do vírus padrão.....	29
2.4.3.3 Titulação viral.....	30
2.4.3.4 Pesquisa de anticorpos neutralizantes.....	31
2.4.3.5 Controle das TCID50.....	33
2.4.4 Análise estatística.....	34
2.5 Resultados.....	35
2.5.1 Teste de VN.....	35
2.5.2 Análise estatística.....	37
2.6 Discussão.....	40
2.7 Conclusões.....	42
2.8 Referências.....	43

CAPÍTULO 3 – OCORRÊNCIA DE ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM REBANHOS BOVINOS NOS ESTADOS DE MINAS GERAIS E SÃO PAULO.....	48
3.1 Introdução.....	49
3.2 Revisão de literatura.....	50
3.3 Objetivo.....	57
3.4 Material e métodos.....	58
3.4.1 Triagem dos rebanhos.....	58
3.4.2 Teste de virusneutralização - VN.....	58
3.4.3 Seleção dos rebanhos.....	59
3.4.4 Pesquisa de bovinos PI.....	59
3.4.5 Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa – RT-PCR.....	59
3.4.5.1 Extração do ácido nucléico.....	59
3.4.5.2 Oligonucleotídeos iniciadores – “primers”.....	61
3.4.5.3 Transcrição reversa – RT.....	61
3.4.5.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	62
3.4.5.5 Análise dos produtos da RT-PCR.....	62
3.5 Resultados.....	64
3.5.1 Rebanhos selecionados.....	64
3.5.2 Colheita das amostras pareadas.....	65
3.5.3 Teste de VN – amostras pareadas.....	67
3.5.3.1 Rebanho 1.....	67
3.5.3.2 Rebanho 4.....	68
3.5.3.3 Rebanho 17.....	69
3.5.4 RT-PCR.....	71
3.6 Discussão.....	73
3.7 Conclusões.....	76
3.8 Referências.....	77
 CAPÍTULO 4 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ESTIRPES DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA DETECTADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS...	 82
4.1 Introdução.....	83
4.2 Revisão de literatura.....	84
4.3 Objetivos.....	89
4.4 Material e métodos.....	90
4.4.1 Amostras.....	90
4.4.2 RT-PCR.....	90
4.4.3 Sequenciamento viral.....	90
4.4.4 Análise filogenética.....	91
4.5 Resultados.....	93
4.5.1 Sequenciamento viral.....	93

Página

4.5.2 Análise filogenética.....	93
4.6 Discussão.....	95
4.7 Conclusões.....	97
4.8 Referências.....	98
CAPÍTULO 5 – COMPARAÇÃO DOS TESTES DE VIRUSNEUTRALIZAÇÃO CONTRA OS GENÓTIPOS 1 E 2 DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV 1 E BVDV 2) EM REBANHOS BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS.....	104
5.1 Introdução.....	105
5.2 Revisão de literatura.....	106
5.3 Objetivos.....	110
5.4 Material e métodos.....	111
5.4.1 Amostras.....	111
5.4.2 Teste de virusneutralização – VN.....	111
5.4.3 Análise estatística.....	112
5.5 Resultados.....	114
5.5.1 Teste de VN.....	114
5.5.2 Análise estatística.....	114
5.6 Discussão.....	116
5.7 Conclusões.....	118
5.8 Referências.....	120
CAPÍTULO 6 – MONITORAMENTO DA INFECÇÃO NATURAL PELO BVDV EM REBANHOS BOVINOS.....	123
6.1 Introdução.....	124
6.2 Revisão de literatura.....	125
6.3 Objetivo.....	130
6.4 Material e métodos.....	131
6.4.1 Rebanhos.....	131
6.4.2 Amostras.....	132
6.4.3 Teste de virusneutralização – VN.....	134
6.4.4 Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa – RT-PCR.....	134
6.5 Resultados.....	135
6.5.1 Teste de VN.....	135
6.5.2 RT-PCR.....	135
6.6 Discussão.....	141
6.7 Conclusões.....	151
6.8 Referências.....	152
CAPÍTULO 7 – IMPLICAÇÕES.....	155

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Análise para a detecção do BVDV, por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, dos produtos (290 pb) amplificados pela RT-PCR em amostras pareadas de soro sanguíneo do rebanho 4.....	72
Figura 2. Árvore filogenética, com base em 248 pares de bases da região 5'UTR de 23 estirpes de BVDV, uma estirpe do BDV e uma estirpe do CSFV. As seqüências BR-UNESP-JAB 1 e BR-UNESP-JAB 2 foram comparadas com seqüências obtidas no "GenBank".....	94
Figura 3. Análise para a detecção do BVDV, por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, do produto (290 pb) amplificado pela RT-PCR em amostra de soro sanguíneo do rebanho 4.....	140

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Comparação das reações de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizadas em amostras de soro sangüíneo de bovinos não vacinados contra o BVDV em rebanhos dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006.....	36
Tabela 2. Comparação das reações de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizadas em amostras de soro sangüíneo de bovinos não vacinados contra o BVDV em rebanhos do Estado de Minas Gerais no período de janeiro de 2005 a abril de 2006.....	36
Tabela 3. Comparação das reações de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizadas em amostras de soro sangüíneo de bovinos não vacinados contra o BVDV em rebanhos do Estado de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006.....	36
Tabela 4. Número de bovinos reagentes de acordo com a faixa etária, bem como a variação dos títulos de anticorpos nos testes de VN contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2, em rebanhos localizados no Estado de Minas Gerais no período de janeiro de 2005 a abril de 2006.....	38
Tabela 5. Número de bovinos reagentes de acordo com a faixa etária, bem como a variação dos títulos de anticorpos nos testes de VN contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2, em rebanhos localizados no Estado de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006.....	39
Tabela 6. Resultados dos testes de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2, com os respectivos títulos de anticorpos das amostras reagentes, realizados no soro sangüíneo de bovinos com 6 a 12 meses de idade provenientes de rebanhos localizados nos Estados de Minas Gerais e de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006.....	66
Tabela 7. Número total de bovinos analisados pela VN para o BVDV 1 e o BVDV 2; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas pareadas; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas não pareadas no rebanho 1.....	68

Tabela 8.	Número total de bovinos analisados pela VN para o BVDV 1 e o BVDV 2; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas pareadas; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas não pareadas no rebanho 4.....	69
Tabela 9.	Número total de bovinos analisados pela VN para o BVDV 1 e o BVDV 2; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas pareadas; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas não pareadas no rebanho 17.....	70
Tabela 10.	Número total de amostras não reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2, nos testes de VN; amostras não reagentes apenas ao BVDV 1; amostras não reagentes apenas ao BVDV 2; e amostras de bovinos com menos de seis meses de idade, analisadas pela RT-PCR para a detecção do BVDV.....	71
Tabela 11.	Estirpes de referência do BVDV, com respectivo subgenótipo, estirpes de referência do CSFV e do BDV, bem como origem e número de acesso no “GenBank”, utilizadas para comparação na análise filogenética das amostras de BVDV detectadas no Estado de Minas Gerais.....	92
Tabela 12.	Localização dos rebanhos, número de colheitas realizadas por rebanho e número total de amostras de soro sanguíneo de bovinos utilizadas na comparação dos resultados dos testes de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2.....	113
Tabela 13.	Número de bovinos reagentes ao BVDV 1, número de bovinos reagentes ao BVDV 2, número de bovinos reagentes tanto ao BVDV1 quanto ao BVDV 2, bem como a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes das amostras reagentes colhidas em 27 rebanhos entre os meses de janeiro de 2005 e julho de 2007.....	115
Tabela 14.	Caracterização dos rebanhos analisados no monitoramento da infecção natural do BVDV.....	131

Página

Tabela 15. Colheitas de amostras de sangue nos rebanhos (1, 4 e 17) conforme o intervalo de tempo (meses), a categoria e o número de animais analisados.....	133
Tabela 16. Resultado dos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados nas amostras de soro sangüíneo do rebanho 1, de acordo com a faixa etária, em tempos diferentes de colheitas.....	136
Tabela 17. Resultado dos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados nas amostras de soro sangüíneo do rebanho 4, de acordo com a faixa etária, em tempos diferentes de colheitas.....	137
Tabela 18. Resultado dos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados nas amostras de soro sangüíneo do rebanho 17, de acordo com a faixa etária, em tempos diferentes de colheitas.....	138
Tabela 19. Total de amostras não reagentes na VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2, total de amostras não reagentes na VN apenas para um dos genótipos e total de amostras de bovinos com menos de seis meses de idade analisadas pela RT-PCR em diferentes tempos de colheitas nos rebanhos monitorados para a infecção natural pelo BVDV.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS

BDV – vírus da doença da fronteira dos ovinos (*border disease virus*)

BoHV1 – herpesvírus bovino tipo 1 (*bovine herpesvirus 1*)

bPI3 – parainfluenza bovino tipo 3 (*bovine parainfluenza 3*)

BRSV – vírus sincicial respiratório bovino (*bovine respiratory syncytial virus*)

BVD – diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea*)

BVDV – vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea virus*)

cDNA - DNA complementar

CP - citopatogênico

CSFV – vírus da peste suína clássica (*classical swine fever virus*)

DEPC – dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desorribonucleotídeo trifosfatado

ECP – efeito citopatogênico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylene diamine tetracetic acid*)

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

MD – doença das mucosas (*mucosal disease*)

MDBK – *Madin Darby bovine kidney*

MEM – meio essencial mínimo (*minimum essential medium*)

M-MLV-RT - *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

NCP – não citopatogênico

OIE – Organização Mundial para Saúde Animal

ORF - *open reading frame*

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase reaction chain*)

PI – persistentemente infectado (*persistently infected*)

RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (*reverse transcription*)

RT-nPCR – *nested* RT-PCR

SFB – soro fetal bovino

Taq – *Thermus aquaticus*

TCID₅₀ – dose infectante em cultura de tecidos 50% (*50% tissue culture infective dosis*)

TEB – tampão tris/borato/EDTA

TI – transitoriamente infectado (*transiently infected*)

Tris-HCL – *Trishydroxymethylaminomethane hydrochloride*

VN - virusneutralização

**DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVD): ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO
PERSISTENTE, AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA RESPOSTA IMUNE E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS**

RESUMO – A ocorrência de anticorpos neutralizantes contra os genótipos do vírus da diarreia viral bovina (BVDV 1 e BVDV 2) foi verificada, pelo teste de virusneutralização (VN), em 260 amostras de soro sangüíneo de 26 rebanhos não vacinados contra o BVDV, provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Do total de amostras, 102 (39,2%) reagiram ao BVDV, das quais 81 (31,1%) foram reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2, sete (2,7%) reagiram apenas ao BVDV 1 e 14 (5,4%) reagiram apenas ao BVDV 2. Nos mesmos rebanhos, verificou-se também a presença sugestiva de animais persistentemente infectados (PI) por meio da pesquisa de anticorpos neutralizantes em cinco amostras de soro sangüíneo de bezerros sentinelas com idade entre 6 e 12 meses. A ocorrência de animais PI foi pesquisada em três dos 26 rebanhos, dos quais foram colhidas amostras pareadas de sangue de todos os animais do rebanho. Todas as amostras foram submetidas ao teste de VN contra o BVDV 1 e o BVDV 2, e naquelas não reagentes a pelo menos um dos genótipos, bem como nas amostras provenientes de bovinos com menos de seis meses de idade, foi realizada a pesquisa do vírus pela RT-PCR. Em um dos rebanhos foram detectados dois animais PI, cujas estirpes foram caracterizadas geneticamente como pertencentes ao subgenótipo BVDV 1b. A infecção natural pelo BVDV foi monitorada nos três rebanhos selecionados para a pesquisa de animais PI, sendo que em dois deles constatou-se a eliminação do BVDV. No entanto, a infecção permaneceu no rebanho em que haviam sido detectados dois animais PI, pois foram diagnosticados posteriormente um animal transitoriamente infectado (TI) e novos animais reagentes ao vírus. Foram submetidos à análise estatística os resultados dos testes de VN contra o BVDV 1 e o BVDV 2, realizados em 1925 amostras de soro sangüíneo obtidas no período de execução desta pesquisa. Não houve discordância entre a proporção de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 ($p>0,05$), entretanto, houve discordância

entre os títulos de anticorpos das amostras reagentes a ambos os genótipos ($p < 0,0001$).

Palavras-chave: análise filogenética, animal persistentemente infectado, animal transitoriamente infectado, anticorpos neutralizantes, BVDV 1, BVDV 2

**BOVINE VIRAL DIARRHOEA (BVD): EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF
PERSISTENT INFECTION, SEROLOGICAL EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE
AND MOLECULAR VIRUS CHARACTERIZATION**

SUMMARY – The occurrence of neutralizing antibodies against to bovine viral diarrhoea virus genotypes (BVDV 1 and BVDV 2) has been confirmed by virus neutralization test (VN) in 260 samples of blood serum undertaken in the states of Minas Gerais and São Paulo, Brazil. Samples were retrieved from 26 cattle herds which were not BVDV vaccinated. One hundred and two samples (39.2%) were reagents to BVDV, or rather, 81 (31.1%) were reagents to BVDV 1 and BVDV 2, seven (2.7%) were reagents to BVDV 1 only and 14 (5.4%) were reagents to BVDV 2 only. In the same herds, the significant presence of persistently infected (PI) animals was also verified by a research involving neutralizing antibodies in five samples of blood serum in 6 to 12-month-old calves. The occurrence of PI animals was researched in three out of 26 herds by paired blood samples of total animals in the herd. All samples were analyzed by VN test against to BVDV 1 and BVDV 2, and virus research was undertaken by RT-PCR in samples which were not reagent to at least one of the genotypes and in samples of less than 6-month-old cattle. Two PI animals, genetically characterized as belonging to BVDV 1b subgenotype, were detected in one of the herds. BVDV natural infection was monitored in three herds selected for PI animals research. BVDV was eliminated in two herds. However, infection remained in the herd in which two PI animals were diagnosed, because a transiently infected animal (TI) and other virus-reagent animals were detected later on. Statistical analysis evaluated VN test results against BVDV 1 and BVDV 2 with 1925 samples of blood serum obtained during the research period. Although no significant differences were found between BVDV 1 reagent bovines and BVDV 2 reagent ones ($p>0.05$), a significant difference was detected among titres of antibodies from samples which were reagent to both genotypes ($p<0.0001$).

Keywords: BVDV 1, BVDV 2, neutralizing antibodies, persistently infected animal, phylogenetic analysis, transiently infected animal

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Ao contrário da denominação original, relacionada a transtornos do sistema digestório, a diarreia viral bovina (BVD) é caracterizada principalmente por alterações no sistema reprodutivo dos bovinos. O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) possui predileção por útero gestante, pois a infecção fetal é a única maneira de garantir a sua sobrevivência e perpetuação nos rebanhos, pela geração de um animal com infecção persistente. O animal persistentemente infectado (PI) é o elemento de destaque da BVD. Ele consiste na principal fonte de infecção, e toda a dinâmica da enfermidade ocorre em função da sua presença no rebanho.

No diagnóstico clínico da BVD nos rebanhos é necessário o conhecimento dos contrastes existentes entre as manifestações clínicas da enfermidade, que variam desde uma forma inaparente até a síndrome fatal da doença das mucosas (MD). A complexidade das manifestações clínicas também está associada à redução da produtividade animal, ao comprometimento do desempenho reprodutivo, além do efeito imunossupressor causado pelo vírus, que propicia o surgimento de outras afecções, tornando o BVDV um dos mais importantes agentes infecciosos na bovinocultura.

A BVD teve sua primeira descrição em 1946. Durante os últimos 60 anos ocorreram avanços no conhecimento do vírus e da enfermidade, tais como a determinação dos biótipos e genótipos do BVDV, a produção de anticorpos monoclonais utilizados nos estudos das estirpes variantes, o seqüenciamento do genoma viral, os mecanismos de desenvolvimento da infecção persistente, da imunotolerância, da MD e da ação imunossupressiva na infecção aguda (GOYAL & RIDPATH, 2005).

A diversidade dos aspectos relacionados à BVD proporcionou que os resultados encontrados neste trabalho fossem analisados por vários parâmetros. Isso permitiu a apresentação da tese em forma de capítulos, e neles também foi feita uma abordagem sobre a enfermidade, desde a caracterização do seu agente etiológico até as medidas

de prevenção e controle. Dessa maneira, os experimentos foram inseridos nos capítulos de acordo com os temas relacionados na caracterização.

A importância da BVD na bovinocultura, os principais aspectos epidemiológicos e as diferentes manifestações clínicas da enfermidade estão abordados nesse 1º Capítulo. A distribuição geográfica da BVD, os estudos de prevalência e ocorrência, no Brasil e em outros países, estão abordados no Capítulo 2, que também apresenta a pesquisa da ocorrência de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 em rebanhos localizados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo.

O animal PI é o tema do Capítulo 3, o qual relata a ocorrência desse tipo de animal nos mesmos rebanhos analisados no capítulo anterior. O diagnóstico de animais PI num dos rebanhos, localizado no Estado de Minas Gerais, propiciou a detecção de estirpes do BVDV que foram geneticamente caracterizadas. A análise filogenética dessas estirpes, assim como a abordagem da diversidade genética de estirpes do BVDV isoladas em vários países, inclusive no Brasil, estão apresentadas no Capítulo 4.

A diversidade genética do BVDV também traduz em diversidade antigênica, pois são encontrados diferentes resultados nos testes de vírusneutralização (VN) realizados com diferentes estirpes do vírus. O enfoque do Capítulo 5 está relacionado justamente a essa diversidade antigênica, e o experimento nele inserido correlaciona animais reagentes, bem como seus respectivos títulos anticorpos neutralizantes, a estirpes do BVDV 1 e do BVDV 2.

O Capítulo 6 descreve o monitoramento dos rebanhos em que foram pesquisados os animais PI (abordados no Capítulo 3) por um período que variou de 17 a 29 meses. Nesse capítulo, são citadas também as principais medidas de controle e prevenção da BVD, a possibilidade da eliminação espontânea do BVDV num rebanho, além dos fatores de risco envolvidos na transmissão da enfermidade.

Por fim, o Capítulo 7 apresenta uma análise sobre os resultados encontrados em todos os capítulos desta tese e suas relações com a ocorrência e o diagnóstico da enfermidade nos rebanhos bovinos nacionais. Nele também estão mencionados os programas de controle e erradicação adotados por alguns países europeus, ratificando assim a importância da BVD na bovinocultura.

1.1 ASPECTOS GERAIS DA EPIDEMIOLOGIA DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA

A BVD é um conjunto de síndromes clínicas ou subclínicas associadas à infecção pelo BVDV (BOLIN & RIDPATH, 1996). A enfermidade é bastante comum na maioria dos países, e o BVDV é um patógeno de bovinos, particularmente do sistema reprodutivo (BROWNLIE, 2005). Dentre os vírus que infectam bovinos, é o que possui a patogenia mais complexa (DEREGT, 2005).

Desde os primeiros relatos de uma nova enfermidade aparentemente transmissível, descritos por OLAFSON et al. (1946), o BVDV está relacionado a um complexo de síndromes que afetam os sistemas reprodutivo, respiratório, digestório, circulatório, imunológico, linfático, musculoesquelético e o sistema nervoso central, sendo denominado como um patógeno que apresenta muitas faces (BROCK, 2004).

O BVDV é um RNA-vírus, que juntamente com o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da “border disease” (BDV) compõem o gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, e são classificados junto com *Flavivirus* humanos e o vírus da hepatite C (NETTLETON & ENTRICAN, 1995). O BVDV pertence a um grupo de vírus que infecta primariamente ruminantes (RIDPATH, 2003).

Atualmente são reconhecidas quatro espécies do gênero *Pestivirus*: CSFV, BDV, BVDV 1 e BVDV 2 (ICTV, 2007). Inicialmente o *Pestivirus* era classificado com base na espécie hospedeira em que foi realizado o primeiro isolamento. No entanto, essa classificação tornou-se inadequada, pois eles não infectam apenas uma única espécie (RIDPATH, 2005).

As espécies pertencentes ao gênero *Pestivirus* são antigenicamente relacionadas, embora existam diferenças que não são suficientes o bastante para classificá-las em sorotipos. Todavia, após várias tentativas para a classificação viral com anticorpos monoclonais e por comparações das seqüências gênicas, o BVDV foi classificado em duas diferentes espécies – BVDV 1 e BVDV 2 (RIDPATH, 2005).

O BVDV é um vírus pequeno (40 a 60 nm), esférico e possui um envoltório lipoprotéico derivado das membranas das células hospedeiras. O nucleocapsídeo tem como genoma uma fita única de RNA, de polaridade positiva, numa molécula de

aproximadamente 12,3 kb, com predisposição a altas taxas de mutação (RIDPATH, 2005). Essas mutações levam à heterogeneidade do BVDV, que propicia a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (RIDPATH, 2003; KELLING, 2004).

O virion é resistente às variações de pH de 5,7 a 9,3, ao contrário dos demais vírus da família *Flaviviridae*, e consegue sobreviver no meio ambiente até duas semanas, mas são rapidamente inativados pelo calor, por solventes orgânicos, detergentes e desinfetantes comuns, como fenóis e clorexidine (KELLING, 1996; RIDPATH, 2005).

Com base na sua replicação em culturas de células, o BVDV apresenta dois biótipos: citopatogênico (CP) e não citopatogênico (NCP) (TREMBLAY, 1996). Os biótipos são grupos de vírus com a mesma constituição genética, porém possuem diferenças na indução de alterações microscópicas visíveis (vacuolização e lise) em cultivos celulares epiteliais *in vitro* (KELLING, 1996).

O fato de um dos biótipos não ser CP não significa que o mesmo não seja patogênico e somente cause infecções subclínicas nos animais. Portanto, os biótipos são classificados pela habilidade em causar alterações visíveis em culturas celulares epiteliais e não quanto à capacidade de causar enfermidade no animal (DEREGT & LOEWEN, 1995). A citopatogenicidade em cultivos celulares não está correlacionada à virulência em infecções agudas *in vivo*, pois todos os vírus altamente virulentos, até então estudados, eram NCP (RIDPATH, 2005).

No entanto, os biótipos se comportam diferentemente *in vivo*. As estirpes NCP apresentam tropismo por leucócitos, órgãos linfóides e pelo trato respiratório, enquanto as estirpes CP estão restritas ao trato digestório (HAMERS et al., 2001). A grande maioria das estirpes do BVDV isoladas no campo são NCP e as estirpes CP são menos frequentes, por serem isoladas principalmente de casos de MD (DEREGT & LOEWEN, 1995).

Para RIDPATH et al. (2006), podem existir três biótipos do BVDV: o biótipo NCP, que não causa morte celular em cultivos celulares epiteliais ou cultivo de células linfóides; o biótipo CP, o qual promove morte celular em cultivos celulares epiteliais ou linfóides; e o biótipo linfocitopatogênico, que não causa morte celular em cultivo de

células epiteliais, mas causa morte de células em cultivo linfóide. O significado prático do biótipo linfocitopatogênico está relacionado com a virulência *in vivo*, e o cultivo de células linfóides é de grande importância no estudo dos efeitos da infecção do BVDV no sistema imune do animal.

Além da divisão em biótipos, a análise filogenética do genoma viral levou à segregação do BVDV em dois genótipos: BVDV 1 e BVDV 2 (RIDPATH et al., 1994). As estirpes altamente virulentas relacionadas a surtos severos de BVD aguda ocorridos no início da década de 90, com trombocitopenia, disfunções hemorrágicas e alta mortalidade de animais de todas as idades, em rebanhos dos Estados Unidos e do Canadá (CORAPI et al., 1989; CARMAN et al., 1998), foram classificadas como pertencentes ao BVDV 2, enquanto as estirpes clássicas foram classificadas como BVDV 1 (RIDPATH et al., 1994).

Alguns anos após a sua identificação, o BVDV 2 ainda era considerado um vírus novo e altamente virulento. Entretanto, ele tem sido mais frequentemente isolado de várias condições clínicas moderadas ou subclínicas do que necessariamente de casos severos ou hemorrágicos, embora ainda existam tentativas de correlacionar o BVDV 1 e o BVDV 2 com a virulência (FULTON et al., 2000). As estirpes do BVDV 2 estão presentes em alguns países, e a maioria delas não são virulentas como as estirpes do BVDV 1 (GUNN et al., 2004).

Vários pesquisadores acreditavam que o BVDV 2 era uma variante recente do BVDV 1, decorrente da pressão seletiva resultante de programas de vacinação, mas não existiram evidências sugestivas da ocorrência de mutações que diferenciasssem os isolamentos do BVDV 1 e do BVDV 2. As diferenças existentes entre os dois genótipos sugerem que o BVDV 2 existe na natureza assim como o BVDV 1 e, desta forma, é bem mais provável que o BVDV 2 represente um grupo de vírus recém-identificado e não um novo grupo de vírus (FLORES et al., 2002; RIDPATH, 2005).

Apesar do BVDV 2 ter sido descrito em 1994, a caracterização de estirpes de BVDV isoladas entre os anos de 1981 e 1994 demonstrou que este genótipo ocorria nos EUA desde o início da década de 80. Além disso, foi concluído que a sua primeira descrição consistiu numa estirpe isolada num suíno em 1979 na Europa, depois de

realizadas comparações com amostras de BVDV 2. Nessa época, a estirpe foi denominada como atípica do CSFV (RIDPATH, 2005).

Os genótipos BVDV 1 e BVDV 2 também foram subdivididos nos subgenótipos BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2a e BVDV 2b (RIDPATH et al., 1994; RIDPATH et al., 2000; FLORES et al., 2002). Para VILCEK et al. (2001), o BVDV 1 é subdividido em 11 grupos genéticos. A subdivisão dos genótipos, bem como o seu significado biológico, ainda continuam em discussão (RIDPATH, 2005).

A manutenção do BVDV nos rebanhos ocorre somente pela presença de um animal com infecção persistente. O animal PI é resultante da infecção uterina pelo biótipo NCP nos primeiros 125 dias de gestação. Nessa fase, o sistema imune do feto não está totalmente desenvolvido e não reconhece o vírus como estranho (DEREGT & LOEWEN, 1995; GROOMS, 2004).

O animal PI é a principal fonte de infecção da BVD. Mas também são fontes de infecção os bovinos em fase aguda da doença, também denominados transitoriamente infectados (TI), bubalinos, ovinos, caprinos, suínos (HOUE, 1995) e algumas espécies silvestres, como antílopes, cervídeos, alces, camelos, lhamas, alpacas e guanacos (EVERMANN, 2006). As vias de eliminação do vírus são as excreções e as secreções corporais, como fezes, urina, leite, sêmen, saliva, lágrima, secreções nasais e uterinas, além do sangue e da placenta.

A transmissão do BVDV ocorre principalmente pelo contato direto. Fêmeas PI transmitem o vírus para sua descendência (TREMBLAY, 1996). O contato indireto também é importante na transmissão do BVDV, o qual pode ser realizado por meio de fômites como luvas para palpação retal, agulhas, formigas para contenção, utensílios, cochos para alimentação (TREMBLAY, 1996; NISKANEN & LINDBERG, 2003; MOEN et al., 2005) e medicamentos contaminados (KATHOLM & HOUE, 2006).

A transmissão do vírus também pode ser aerógena (MARS et al., 1999) ou realizada mecanicamente pelos insetos (GUNN, 1993). A transmissão aerógena pode ser influenciada pela estirpe infectante do BVDV, pois algumas delas induzem alterações respiratórias e conseqüentemente desencadeiam tosse nos animais, promovendo assim maior disseminação viral (HOUE, 1995). O soro fetal bovino

contaminado utilizado na transferência de embriões, e os embriões de doadoras PI, podem transmitir o vírus para as receptoras, assim como as receptoras PI ou TI podem transmitir o BVDV para o embrião (GIVENS & WALDROP, 2004; GARD et al., 2007).

A porta de entrada do BVDV no organismo é pela mucosa oral ou nasal, por meio da inalação ou ingestão de secreções e excreções de animais infectados. Os primeiros sítios de replicação viral são as tonsilas, os tecidos linfóides e o epitélio da orofaringe (TREMBLAY, 1996). A disseminação para o organismo ocorre pelas células linfóides presentes na corrente circulatória (THURMOND, 2005). A mucosa genital também é porta de entrada para o BVDV (GARD et al., 2007).

A disseminação do vírus no rebanho está relacionada com a maneira pela qual ele foi introduzido. Se o BVDV for proveniente de um animal TI, a disseminação é mais lenta do que se a fonte de infecção for um animal PI, pois este elimina o vírus constantemente e em grande quantidade (TREMBLAY, 1996).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA

O período de incubação da BVD é de aproximadamente 5 a 7 dias, e a viremia é detectada nas primeiras 24 horas após a infecção, podendo persistir por até 15 dias. Na maioria das vezes, as infecções nos bovinos ocorrem de forma inaparente ou pouco característica, com sinais de hipertermia transitória e leucopenia. Estima-se que 70% a 90% das infecções ocorrem sem manifestações de sinais clínicos (BAKER, 1995). Os sinais da infecção num rebanho são normalmente muito inespecíficos, por isso sempre é necessária a confirmação laboratorial (DONATE & MAZZUCHELLI, 1995).

Os sinais clínicos apresentados pelos animais com infecções agudas são hipertermia, leucopenia, depressão, anorexia, descarga oculonasal, diarréia, decréscimo na produção de leite em vacas leiteiras, erosões e ulcerações orais, interdigitais e nos tetos (BAKER, 1995; CAMPBELL, 2004; EVERMANN & BARRINGTON, 2005), pneumonia e enterite em bezerros (POTGIETER, 1997). A morte após a infecção aguda pelo BVDV deve-se principalmente a infecções bacterianas secundárias (BÖTTCHER et al., 1993).

A infecção aguda severa, também denominada síndrome hemorrágica, apresenta alta morbidade e alta letalidade. Os animais acometidos apresentam sinais como febre, depressão, leucopenia, trombocitopenia, diarréia sanguinolenta, hemorragia ocular, epistaxe, equimoses nas mucosas, lesões no trato digestório, hemorragias subcutâneas e nos locais de injeção. Mas, durante um surto de BVD hemorrágica, podem existir variações nos sinais clínicos apresentados no rebanho e apenas uma minoria dos animais infectados apresenta sinais de maior severidade, que são semelhantes aos da MD (EVERMANN & BARRINGTON, 2005).

O BVDV desencadeia um efeito imunossupressor e com isso aumenta a patogenicidade de outros microorganismos (HOLLAND et al., 1993). O vírus proporciona o aumento considerável na incidência e severidade de enfermidades do trato respiratório (OBANDO et al., 1999) causadas pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos (BoHV-1), pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) ou pela

Mainhemia haemolytica (POTGIETER, 1997), além de outras enfermidades (POTGIETER, 1995; CAMPBELL, 2004; GALAV et al., 2007).

Vários estudos epidemiológicos atribuíram ao BVDV o importante papel no complexo respiratório bovino (CAMPBELL, 2004), como agente infeccioso primário ou como agente imunossupressor (FULTON et al., 2006). As infecções pulmonares sinérgicas entre o BVDV e outros patógenos bacterianos são comuns durante o primeiro ano de vida (TREMBLAY, 1996), pois facilitam a colonização do trato respiratório inferior resultando em broncopneumonia fibronecrótica (LONERAGAN et al., 2005).

A habilidade que o BVDV possui de interagir sinergicamente com outros patógenos não é restrita somente às enfermidades que acometem o trato respiratório, uma vez que foram descritas infecções sinérgicas com patógenos entéricos como *Coronavirus* e *Rotavirus* (KAPIL et al., 2005). A imunossupressão transitória deve-se à replicação do BVDV nos monócitos, nos linfócitos B, nos linfócitos T, nas células epiteliais do trato digestório e do trato respiratório superior (TREMBLAY, 1996; PETERHANS et al., 2003).

O BVDV foi também associado a alterações neurológicas em bovinos (BLAS-MACHADO et al., 2004), sendo freqüentemente isolado do cérebro de fetos abortados e natimortos. No entanto, poucas informações correlacionaram a ocorrência de sinais clínicos neurológicos às infecções pelo BVDV (FLORES et al., 2005).

Apesar de ter sido originalmente associado a casos de doença entérica, a patogenia do BVDV mostra que sua atuação essencial está relacionada aos processos reprodutivos nos bovinos. Por isto, o maior impacto econômico é causado pelos transtornos reprodutivos (ELLIS et al., 1995), pois toda a epidemiologia da BVD está relacionada à infecção fetal e ao nascimento de bezerros PI (FLORES, 1997). A primeira relação sugestiva do envolvimento do BVDV com alterações reprodutivas foi descrita por McCLURKIN et al. (1979).

O feto é vulnerável à infecção quando fêmeas não imunes entram em contato com o BVDV. Em termos gerais, a infecção transplacentária é particularmente prejudicial durante os primeiros 180 dias de gestação e pode resultar em morte e

reabsorção embrionária, morte e mumificação fetal, aborto, deformidades congênitas, imunotolerância (LARSON, 1996; FRAY et al., 2000; GROOMS, 2004), natimortos, nascimento de bezerros fracos, débeis, prematuros e com alterações no crescimento (KRAMPS et al., 1999). Os abortos podem ocorrer em qualquer fase da gestação, mas a ocorrência maior é no primeiro trimestre (LARSON, 1996). Quando a infecção fetal ocorre no estágio final de gestação, também existe o comprometimento do sistema imune dos bezerros (FRAY et al., 2000).

A ação teratogênica do BVDV é maior entre os dias 100 e 150 de gestação (SPRECHER et al., 1991; HOUE, 1995; MOENNIG & LIESS, 1995; BROCK, 2003; GROOMS, 2004). Entretanto, muitas das malformações congênitas são decorrentes de infecções no primeiro trimestre, que é o período de diferenciação dos órgãos. A infecção no segundo trimestre de gestação resulta mais em respostas inflamatórias e processos reparatórios no feto do que propriamente em malformações (BIELEFELDT-OHMANN, 1995).

As principais malformações congênitas associadas à infecção fetal pelo BVDV são hipoplasia cerebelar, microencefalopatia, hidrocéfalo, hidrocefalia, porencefalia, hipomielinização, desmielinização da medula espinhal, catarata, microftalmia, degeneração da retina, neurite óptica, coriorretinopatia, hipoplasia do timo, hipotricose, alopecia, osteogênese degenerativa, bragnatismo mandibular, retardo do crescimento, “hyena disease” e hipoplasia pulmonar (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; GROOMS, 2004).

Algumas infecções pelo BVDV podem tornar-se aparentes após o nascimento de bezerros com malformações congênitas. Mesmo sendo possível a ocorrência de diferentes tipos de malformações congênitas, vários nascimentos consecutivos num rebanho podem apresentar o mesmo tipo de lesão congênita. A estirpe do BVDV infectante pode exercer um papel na determinação anatômica do defeito congênito, pois algumas estirpes parecem possuir um grau de especificidade orgânica (REBHUM, 1995).

A patogenia do BVDV sobre a reprodução não se limita apenas a abortos ou malformações congênitas, mas também está associada a falhas reprodutivas antes da

concepção, durante a fecundação e nos primeiros dias de vida do embrião (DONATE & MAZZUCHELLI, 1995), em consequência do tropismo do BVDV por células germinativas de ambos os sexos (BROWNLIE, 2005).

Os efeitos do BVDV são verificados nas alterações da dinâmica ovariana e no comprometimento transitório da fertilidade. O vírus pode infectar o ovário e permanecer nele por até 60 dias, ocasionando ovarite e, conseqüentemente, ausência de ovulação, principalmente em novilhas. Alterações inflamatórias também são encontradas no oviduto e na mucosa uterina (GROOMS, 1998; GROOMS, 2004).

Nos touros, os efeitos da infecção estão relacionados aos defeitos morfológicos dos espermatozoides, à baixa qualidade do sêmen, com diminuição da mobilidade e da concentração espermática (DONATE & MAZZUCHELLI, 1995; GROOMS, 2004). O vírus também replica nas vesículas seminais e na próstata (TREMBLAY, 1996).

Segundo VOGES et al. (1998), o BVDV pode estabelecer a infecção persistente nos túbulos seminíferos após a infecção aguda durante a puberdade. Nessa fase, o BVDV consegue atravessar a barreira hemato-testicular, mas os anticorpos neutralizantes produzidos após a infecção aguda são incapazes de atravessar essa mesma barreira, estabelecendo assim a infecção persistente nos túbulos seminíferos e o vírus passa a ser liberado constantemente no sêmen.

Tanto a infecção nos túbulos seminíferos quanto a permanência prolongada do BVDV no ovário são consideradas infecções crônicas persistentes. Vários estudos estão sendo realizados para determinar a prevalência e o potencial dessas infecções que sucedem uma infecção aguda. O estabelecimento de infecções crônicas forneceria um mecanismo adicional para o vírus persistir nos rebanhos bovinos (BROCK, 2003).

A pesquisa realizada por NISKANEN et al. (1995) verificou que rebanhos com alta prevalência de anticorpos tiveram aumento na utilização de medicamentos para a indução do estro, intervalos maiores entre partos, maior frequência de mastite e de retenção de placenta. Rebanhos leiteiros infectados pelo BVDV apresentaram aumento de células somáticas no leite, provavelmente devido à maior incidência de infecções intra-mamárias (BEAUDEAU et al., 2005); maior número de serviços por concepção

(RUFENACHT et al., 2001); e, em novilhas, prolongou o tempo da primeira parição (VALLE et al., 2001).

A BVD e a MD são duas síndromes clínicas diferentes causadas pelo mesmo vírus. A BVD é resultado de uma infecção aguda, de poucos dias de duração e baixa letalidade, que pode ocorrer em bovinos susceptíveis de qualquer idade após o nascimento. Em contraste, a MD apresenta alta letalidade, pois ocorre em bovinos que apresentam imunotolerância específica ao vírus infectante (animais PI) e, conseqüentemente, não desenvolvem anticorpos (DUFFELL & HARKNESS, 1985). A MD pode ser causada tanto pelo BVDV 1 quanto pelo BVDV 2 (RIDPATH et al., 2000).

A MD é uma síndrome fatal. Os sinais clínicos presentes são febre, depressão, anorexia, fraqueza, emaciação, desidratação, lesões orais erosivas, hipersalivação, intenso lacrimejamento, secreção ocular mucopurulenta, diarreia sanguinolenta profusa, lesões erosivas no focinho, nas tetas e na vulva. A enfermidade pode durar 1 a 3 dias ou se estender por 2 a 3 semanas, e culmina com a morte do animal (BAKER, 1995; DEREGT & LOEWEN, 1995).

A MD é considerada uma forma esporádica da infecção pelo BVDV (BAKER, 1995) e ocorre quando animais PI com o vírus NCP sofrem uma infecção com uma estirpe homóloga do vírus CP. Na maioria das vezes, o vírus CP origina-se do vírus NCP persistente por meio de recombinações genéticas (BOLIN & GROOMS, 2004). A expressão da citopatogenicidade é resultante da clivagem da proteína não estrutural NS2-3 do BVDV NCP em NS-2 e NS-3 (BROWNLIE, 2005).

O BVDV CP pode originar-se espontaneamente por inserções no genoma viral de seqüências gênicas do hospedeiro, por duplicação do genoma viral ou por recombinações genéticas com outras estirpes do BVDV (BROWNLIE, 2005). Os pontos de mutação alteram o genótipo, e as recombinações mudam o biótipo, mas não alteram o genótipo. Por isso, os vírus CP são antigenicamente idênticos aos vírus NCP originais (RIDPATH, 2003).

As estirpes CP derivam acidentalmente das estirpes NCP. Sugere-se que elas apresentam uma importante função epidemiológica na eliminação de animais PI. Esta hipótese explica a freqüência estável de animais PI em muitos rebanhos, em torno de

1%, indicando que existe equilíbrio entre a geração e a eliminação de animais PI (HAMERS et al., 2001).

A BVD também é considerada uma das enfermidades de maior dificuldade para diagnóstico e controle (PILLARS & GROOMS, 2002). O primeiro passo para o controle da BVD é identificar e eliminar todos os animais PI do rebanho, por serem a principal fonte de infecção do BVDV NCP (BOLIN, 1990). Vários países da Europa já iniciaram programas de controle e erradicação do BVDV, tais como a Noruega, a Dinamarca e a Alemanha. A Suécia foi o primeiro país a implantar um programa de erradicação, no ano de 1993 (GREISER-WILKE et al., 2003).

Nos países que são livres da febre aftosa, o BVDV passou a ser considerado o agente viral mais importante na bovinocultura. No Brasil, a importância atribuída à febre aftosa durante décadas relegou outras enfermidades virais de bovinos a um segundo plano. Com a provável erradicação da febre aftosa em muitas regiões, essas enfermidades vêm agora despertando crescente interesse de produtores, técnicos, pesquisadores, autoridades sanitárias e, sobretudo, de laboratórios produtores de vacinas (FLORES et al., 2005).

1.3 REFERÊNCIAS

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BEAUDEAU, F.; FOURICHON, C.; ROBERT, A.; JOLY, A.; SEEGER, H. Bulk milk somatic cell counts and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in 7252 dairy herds in Brittany (western France). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 163-167, 2005.

BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection – a window on the pathogenesis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 447-475, 1995.

BLAS-MACHADO, U.; SALIKI, J. T.; DUFFY, J. C.; CASELTINE, S. L. Bovine viral diarrhea virus type 2 – induced meningoencephalitis in a heifer. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 190-194, 2004.

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

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 51-68, 2004.

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

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

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

BROCK, K. V. The many faces of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2004.

BROWNLIE, J. Bovine virus diarrhoea virus. In: BVDV SYMPOSIUM, 2005, Wellington. **Anais...** p. 1-19.

CAMPBELL, J. R. Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 39-50, 2004.

CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J. F. Severe acute bovine viral diarrhea (BVD) in Ontario. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 10, n. 1, p. 27-35, 1998.

CORAPI, W. V.; FRENCH, T. W.; DUBOVI, E. J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3934-3943, 1989.

DEREGT, D. Introduction and history. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 1, p. 3-33.

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

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

DUFFELL, S. J.; HARKNESS, J. W. Bovine virus diarrhoea - mucosal disease infection in cattle. **The Veterinary Record**, London, v. 117, n. 10, p. 240-245, 1985.

ELLIS, J. A.; MARTIN, K.; NORMAN, G. R.; HAINES, D. M. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 7, n. 4, p. 433-436, 1995.

EVERMANN, J. F. Pestiviral infection of llamas and alpacas. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 61, n. 2-3, p. 201-206, 2006.

EVERMANN, J. F.; BARRINGTON, G. M. Clinical features. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 6, p. 105-119.

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

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F., GIL, L. H. V. G. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 51-60, 2002.

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**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

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

FULTON, R. W.; HESSMAN, B.; JOHNSON, B. J.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; SJEKLOCHA, D.; CONFER, A. W.; FUNK, R. A.; PAYTON, M. E. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 228, n. 4, p. 578-584, 2006.

FULTON, R. W.; SALIKI, J. T.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; d'OFFAY, J. M.; HELMAN, R. G.; BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 12, n. 1, p. 33-38, 2000.

GALAV, V.; MISHRA, N.; BUBEY, R.; RAJUKUMAR, K.; PITALE, S. S.; SHRIVASTAV, A. B.; PRADHAN, H. K. Pathogenicity of an Indian isolate of bovine viral diarrhea virus 1b in experimentally infected calves. **Research in Veterinary Science**, London, v. 83, n. 3, p. 364-368, 2007.

GARD, J. A.; GIVENS, M. D.; STRINGFELLOW, D. A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, n. 3, p. 434-442, 2007.

GIVENS, M. D.; WALDROP, J. G. Bovine viral diarrhea virus in embryo and semen production systems. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 21-38, 2004.

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

GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B.; MOENING, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 113-115, 2003.

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

GROOMS, D.; BROCK, K.; PATE, J.; DAY, M. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 3, p. 595-605, 1998.

GUNN, G. J.; STOTT, A. W.; HUMPHRY, R. W. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. **The Veterinary Journal**, London, v. 167, n. 2, p. 143-149, 2004.

GUNN, H. M. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Record**, London, v. 132, n. 23, p. 584-585, 1993.

HAMERS, C.; DEHAN, P.; COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; KERKHOFS, P.; PASTORET, P. P. Diversity among bovine pestiviruses. **The Veterinary Journal**, London, v. 161, n. 2, p. 112-122, 2001.

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

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

ICTV. International Committee on taxonomy of viruses. **ICTVdB – Index of viruses**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 30 ago. 2007.

KAPIL, S.; WALZ, P.; WILKERSON, M.; MINOCHA, H. Immunity and immunosuppression. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 9, p. 157-170.

KATHOLM, J.; HOUE, H. Possible spread of bovine viral diarrhoea virus by contaminated medicine. **The Veterinary Record**, London, v. 158, n. 23, p. 798-799, 2006.

KEELING, C. L. Planning bovine viral diarrhoea virus vaccination programs. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 9, p. 873-877, 1996.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 115-129, 2004.

KRAMPS, J. A.; MAANEN, C. V.; WETERING, G. V.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 135-144, 1999.

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

LONERAGAN, G. H.; THOMSON, D. U.; MONTGOMERY, D. L.; MASON, G. L.; LARSON, R. L. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhea virus in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 226, n. 4, p. 595-601, 2005.

MARS, M. H.; BRUSCHKE, C. J. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Airborne transmission of BHV-1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 197-207, 1999.

McCLURKIN, A. W.; CORIA, M. F.; CUTLIP, R. C. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 174, p. 1116-1119, 1979.

MOEN, A. D.; SOL, J. A. N.; SAMPIMON, O. T. L. I. S. Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 93-98, 2005.

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

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

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

NISKANEN, R.; LINDBERG, A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. **The Veterinary Journal**, London, v. 165, n. 2, p. 125-130, 2003.

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

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

PETERHANS, E.; JUNGI, T. W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 107-111, 2003.

PILLARS, R. B.; GROOMS, D. L. Serologic evaluation of five unvaccinated heifers to detect herds that have cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 499-505, 2002.

POTGIETER, L. N. D. Immunology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 501-520, 1995.

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

REBHUM, C. W. Infectious diseases of the gastrointestinal tract. In: _____ **Diseases of Dairy Cattle**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1995, cap. 6, p. 155-223.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 127-131, 2003.

RIDPATH, J. F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 3, p. 65-80.

RIDPATH, J. F.; BENDELDT, S.; NEILL, J. D.; LIEBLER-TENORIO, E. Lymphocytopathogenic activity *in vitro* correlates with high virulence *in vivo* for BVDV type 2 strains: criteria for a third biotype of BVDV. **Virus Research**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 62-69, 2006.

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

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

RUFENACHT, J.; SCHALLER, P.; AUDIGE, L.; KNUTTI, B.; KUPFER, U.; PETERBANS, E. The effect of infection with bovine viral diarrhoea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, n. 2, p. 199-210, 2001.

SPRECHER, D. J.; BAKER, J. C.; HOLLAND, R. E.; YAMINI, B. An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhea virus in a dairy herd. **Theriogenology**, Stoneham, v. 36, n. 4, p. 597-606, 1991.

THURMOND, M. C. Virus transmission. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 5, p. 91-104.

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

VALLE, P.; MARTIN, S.; SKJERVE, E. Time-to-first calving interval in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) sera-converted dairy herds in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p. 17-36, 2001.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBARA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEJA, S.; SCICLUNA, M. T.; PAIF, V. Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 1, p. 90-115, 2001.

VOGES, H.; HORNER, G. W.; ROWE, S.; WELLENBERG, G. J. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immune-competent, non-viraemic bull. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 165-175, 1998.

CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA OS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV 1 E BVDV 2) EM REBANHOS BOVINOS NOS ESTADOS DE MINAS GERAIS E SÃO PAULO

RESUMO – A ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1 (estirpe Singer) e o BVDV 2 (estirpe VS-253) foi determinada, pelo teste de virusneutralização, em amostras de soro sangüíneo provenientes de 26 rebanhos bovinos não vacinados contra o BVDV, localizados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Foram analisadas 10 amostras por rebanho, sendo cinco de bovinos adultos e cinco de bovinos com idade entre 6 e 12 meses. Do total de 260 amostras analisadas, 102 (39,2%) reagiram ao BVDV, das quais 81 (31,1%) foram reagentes tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, sete (2,7%) reagiram apenas ao BVDV 1 e 14 (5,4%) reagiram apenas ao BVDV 2. Com exceção de dois rebanhos, nos demais foram detectados pelo menos um animal reagente ao BVDV, entretanto num deles foram detectados animais reagentes apenas ao BVDV 2. Em seis rebanhos foram detectados anticorpos neutralizantes nos bovinos da faixa etária de 6 a 12 meses, portanto foram indicativos da infecção recente pelo vírus e também sugestivos da provável presença da fonte de infecção no rebanho. Os dados obtidos mostraram a ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o BVDV em rebanhos bovinos dos Estados analisados, mas os resultados apresentaram diferenças no número de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2, ressaltando assim a necessidade da utilização de estirpes de cada genótipo nos testes de VN para o diagnóstico sorológico do BVDV.

Palavras-chave: anticorpos neutralizantes, BVDV 1, BVDV 2, vírus da diarréia viral bovina, virusneutralização

2.1 INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) faz parte de um grupo distinto de vírus que causam infecções em ruminantes domésticos. Com distribuição cosmopolita, promove grandes perdas econômicas em países que se dedicam à exploração de rebanhos bovinos (GREISER-WILKE et al., 2003), com uma variedade de manifestações clínicas, ressaltando-se entre elas as alterações reprodutivas (HOUE, 2003). Entretanto, a interpretação dessas manifestações representa um desafio para os médicos veterinários, pois uma porcentagem significativa das infecções (70% a 90%) é subclínica (BAKER, 1995).

Os dados referentes à ocorrência da diarreia viral bovina (BVD) no Brasil ainda são restritos. Isso se deve, em parte, ao pequeno número de laboratórios que realiza o diagnóstico da infecção. É provável que ocorram muitos casos não diagnosticados, especialmente aqueles relacionados a transtornos reprodutivos. Da mesma maneira, é possível que grande parte dos diagnósticos realizados no campo esteja sendo feita sem confirmação laboratorial (FLORES, 2003).

Muitos trabalhos relatam a ocorrência do BVDV em vários países, com maior enfoque no diagnóstico dos genótipos e subgenótipos. No Brasil, apesar de algumas pesquisas demonstrarem a ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o BVDV nos rebanhos bovinos, são poucas as informações referentes especificamente ao BVDV 1 e ao BVDV 2.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

A patogenia da infecção pelo BVDV apresenta características peculiares, que se refletem na epidemiologia e não são observadas em outras enfermidades. Nos estudos epidemiológicos da BVD, os principais desafios consistem na detecção do estágio em que se encontra a infecção, da forma que está ocorrendo a difusão do BVDV dentro do rebanho e da maneira pela qual ocorre a disseminação do vírus entre rebanhos, além do desafio em quantificar as perdas econômicas (HOUE, 1999).

Os títulos de anticorpos neutralizantes contra o BVDV são de longa duração após uma infecção natural, podendo persistir para o resto da vida do animal (LINDBERG & HOUE, 2005), pois o declínio destes títulos pode ser observado somente depois de alguns anos (FREDRIKSEN et al., 1999). Entretanto, a ocorrência de uma infecção recente ou da transmissão do BVDV no rebanho pode ser verificada por meio da detecção de anticorpos neutralizantes nos animais jovens (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

A prevalência das infecções pelo BVDV pode ser determinada nos rebanhos pela detecção de animais com anticorpos neutralizantes ou de animais PI (HOUE, 1995; HOUE, 2005). No entanto, as diferentes prevalências que ocorrem entre países ou até mesmo entre regiões são devidas às diferenças existentes na densidade populacional, no tamanho dos rebanhos e no sistema de manejo (HOUE & MEYLING, 1991; HOUE, 1999).

A distribuição geográfica da BVD é mundial, pois entre 50% e 90% da população bovina adulta apresenta anticorpos neutralizantes contra o BVDV (HOUE, 1999; KRAMPS et al., 1999; LINDBERG, 2002). Teoricamente, todos os rebanhos bovinos estão infectados ou já sofreram a infecção num determinado momento (NETTLETON & ENTRICAN, 1995).

No Canadá, a prevalência de bovinos com anticorpos neutralizantes contra o BVDV foi de 40,6% (DURHAM & HASSARD, 1990), e no Zimbábue, MUVAVARIRWA et al. (1995) encontraram 79,2% das amostras reagentes. PAISLEY et al. (1996) verificaram que 68,6% das amostras de bovinos de corte de rebanhos nos Estados

Unidos apresentavam anticorpos contra o BVDV, e na Croácia, BIUK-RUDAN et al. (1998) encontraram 79,2% de bovinos reagentes.

Nos países escandinavos, a prevalência de bovinos reagentes foi estimada em 64% na Dinamarca, 46% na Suécia, 19% na Noruega (NUOTIO et al., 1999) e em 65% nos Países Baixos (KRAMPS et al., 1999). Na Itália, 53,3% das amostras analisadas apresentaram anticorpos contra o BVDV (LUZZAGO et al., 1999), e em várias regiões da Índia, SUDHARSHANA et al. (1999) verificaram que 15,29% das amostras testadas eram reagentes.

A pesquisa realizada no México por MOLES et al. (2002) encontrou 72,3% de bovinos reagentes ao BVDV. No Peru, STAHL et al. (2002) verificaram que 96% dos rebanhos analisados possuíam anticorpos no leite de conjunto. Outra pesquisa semelhante foi realizada por MELÉNDEZ & DONOVAN (2003) em diversas regiões do Chile, onde a proporção de rebanhos reagentes variou de 71,2% a 83%, conforme a região. Em rebanhos bovinos do Vietnã foram encontrados 18% de bovinos reagentes (DUONG et al., 2007).

MOCKELIUNIENE et al. (2004), analisando a prevalência e os fatores epidemiológicos da infecção pelo BVDV na Lituânia, verificaram que a infecção está amplamente difundida naquele país, existindo inclusive uma correlação entre o número e o tamanho de rebanhos reagentes por região analisada. Nessa pesquisa também foi verificado que a quantidade de bovinos reagentes era maior à medida que a faixa etária aumentava.

No Brasil, os primeiros levantamentos sorológicos foram feitos em 1972 por Wizigmann et al., citados por FLORES et al. (2005). Vários estudos sorológicos foram realizados em outros Estados brasileiros, mas do ponto de vista epidemiológico, a quantidade de bovinos reagentes detectados deve ser interpretada com cautela. No geral, esses estudos não foram realizados a partir de amostragem planejada, alguns foram feitos em rebanhos com problemas reprodutivos, outros realizados com amostras provenientes de uma categoria específica de bovinos e a maioria desconsiderou a possibilidade de que parte da sorologia reagente poderia ser resultante da vacinação (FLORES et al., 2005).

No Estado de São Paulo, LANGONI et al. (1995) encontraram 39,5% de bovinos reagentes ao BVDV. No Estado do Rio Grande do Sul, KRAHL et al. (1997) pesquisaram anticorpos em 1.823 amostras e constataram que 23,4% eram reagentes. O estudo realizado por PELLEGRIN et al. (1997), em fêmeas zebuínas da região do Pantanal no Estado do Mato Grosso do Sul, revelou a ocorrência de anticorpos neutralizantes contra BVDV em 43,6% das amostras analisadas.

O Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico em São Paulo realizou, no período de julho de 1995 a agosto de 1997, análises em 4.065 amostras de rebanhos originários de vários Estados brasileiros, com a detecção de 47,7% de reagentes ao BVDV (PITUCO & DEL FAVA, 1998). Na pesquisa realizada por CANAL et al. (1998), em rebanhos bovinos da região Sul do Brasil, 56% das amostras foram reagentes ao BVDV.

RICHTZEINHAIN et al. (1999) avaliaram 2.447 amostras provenientes de 56 propriedades de diversos Estados brasileiros, encontrando bovinos reagentes em 66,11% das amostras do Estado de Minas Gerais, 83,67% do Estado Mato Grosso do Sul, 67,42% do Estado do Paraná, 70,88% do Estado do Rio de Janeiro, 72,95% do Estado do Rio Grande do Sul e 77,85% do Estado de São Paulo, ressaltando na pesquisa que em todas as propriedades havia pelo menos um animal reagente.

No Estado do Rio Grande do Sul, FLORES et al. (2000) pesquisou a ocorrência de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 em 1.134 amostras de soro sanguíneo. Do total de amostras testadas, 280 (24,7%) foram reagentes ao BVDV, e dessas amostras, 28 (2,5%) reagiram somente ao BVDV 1, 37 (3,3%) reagiram apenas ao BVDV 2 e 215 (18,96%) foram reagentes a ambos os genótipos.

No Estado de Goiás, foram encontradas 54,11% de amostras reagentes no estudo realizado por GUIMARÃES et al. (2001), e nas regiões Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo, foram detectados 57,18% de bovinos com anticorpos neutralizantes contra o BVDV em 376 amostras de vacas em lactação de 10 propriedades leiteiras, ressaltando também que todas as propriedades pesquisadas apresentaram bovinos reagentes (DIAS & SAMARA, 2003).

NORONHA et al. (2003) pesquisaram anticorpos contra BVDV em bovinos oriundos de propriedades e matadouros de oito diferentes municípios no Estado da Bahia, encontrando 56% das amostras reagentes. A pesquisa sorológica realizada por MELO et al. (2004), correlacionando a infecção entre o *Neospora caninum*, o BVDV e o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos (BoHV-1) em 24 rebanhos bovinos localizados no Estado de Minas Gerais, encontrou 28,3% de amostras reagentes ao BVDV.

No Estado de Goiás, ALFAIA et al. (2004) verificaram que 64% das amostras de bovinos com mais de 24 meses de idade eram reagentes ao BVDV. QUINCOZES et al. (2007), num inquérito sorológico realizado em rebanhos bovinos localizados em dois Municípios do Estado do Rio Grande do Sul, encontraram 66,32% de amostras reagentes.

A infecção pelo BVDV está amplamente difundida nos rebanhos brasileiros, e as estirpes do vírus isoladas no país apresentam marcante variabilidade antigênica. As análises filogenéticas realizadas nessas estirpes mostraram também a presença do BVDV 1 e do BVDV 2 (OLIVEIRA et al., 1996; CANAL et al., 1998; BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 2000).

Entretanto, na maioria dos trabalhos realizados no Brasil foram pesquisados anticorpos apenas contra o BVDV 1, o que possivelmente resultaria na falha da detecção de anticorpos em amostras com títulos baixos ou moderados contra o BVDV 2 (FLORES et al., 2005), implicação que justifica a necessidade da utilização de vírus de ambos os genótipos nos testes de VN (FLORES et al., 2000; FULTON et al., 2000; FULTON et al., 2002; CHASE et al., 2003).

2.3 OBJETIVO

Verificar a ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1 e o BVDV 2 em rebanhos bovinos localizados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Rebanhos

Durante o período compreendido entre os meses de janeiro de 2005 e abril de 2006, foram colhidas amostras de sangue em 26 rebanhos bovinos provenientes dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo. No Estado de Minas Gerais foram colhidas amostras em seis rebanhos localizados nos Municípios de Machado, Poço Fundo e São Gonçalo do Sapucaí. No Estado de São Paulo foram colhidas amostras em 20 rebanhos localizados nos Municípios de Jaboticabal, Monte Alto, Sertãozinho, São Carlos, Guariba, Pedregulho, São José do Rio Preto, Cristais Paulista, Buritizal e Rifaina.

Os rebanhos pesquisados não adotavam a vacinação contra o BVDV, eram de exploração leiteira ou de corte, e a quantidade de bovinos nesses rebanhos variava de 20 a 480. Todos os rebanhos foram submetidos à amostragem, independentemente de manejo, sistema de produção, quantidade de animais, raça, produtividade e presença ou não de problemas reprodutivos.

2.4.2 Amostragem

O número de amostras colhidas por rebanho foi embasado na metodologia adotada por LUZZAGO et al. (1999) com algumas modificações. De cada rebanho foram obtidas 10 amostras de sangue, escolhidas ao acaso, sendo cinco amostras de bovinos adultos e cinco amostras de bovinos com idade entre 6 e 12 meses, totalizando 260 amostras. Portanto, foram colhidas 60 amostras no Estado de Minas Gerais e 200 amostras no Estado de São Paulo.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos siliconizados BD[®] contendo vácuo (“vacutainer”), com agulhas 25x8mm específicas para esse tipo de colheita. Nos bovinos adultos, a colheita foi feita por punção na veia coccígea, e nos bovinos jovens, na veia jugular. Foram colhidas amostras dos bovinos que não haviam recebido, nos

últimos 30 dias que precederam a colheita, nenhum medicamento antiparasitário pelas vias injetável, oral, banho de aspersão ou aplicação dorsal (“pour-on”), pois estes medicamentos podem promover toxicidade nos cultivos celulares, comprometendo a interpretação do teste sorológico aplicado.

Depois de colhidas, as amostras permaneceram à temperatura ambiente por 3 horas para a coagulação, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração entre 2°C e 8°C até o momento de serem centrifugadas no laboratório, não permanecendo por mais de 24 horas, devido à possibilidade da ocorrência de hemólise.

No Laboratório de Viroses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP – Câmpus de Jaboticabal/SP, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1.080 G, e de cada amostra foram obtidas duas alíquotas contendo 1,5 mL de soro sangüíneo assim destinadas: uma amostra para o teste contra o BVDV 1 e outra para o teste contra o BVDV 2. As amostras foram distribuídas em microtubos tipo “eppendorf”, identificadas e armazenadas em freezer a -20°C até o momento do uso. A distribuição do soro sangüíneo em mais de uma alíquota foi para que todas as amostras tivessem condições idênticas na manipulação antes do teste sorológico, tanto para o BVDV 1 quanto para o BVDV 2.

2.4.3 Teste de virusneutralização - VN

Todas as amostras foram submetidas ao teste de VN para a pesquisa de anticorpos contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2, conforme preconizado pelo “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals” (OIE, 2007). As reações foram realizadas no Laboratório de Viroses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – FCAV – UNESP – Jaboticabal/SP. No teste de VN foram utilizadas células epiteliais de rim bovino da linhagem permanente “Madin Darby bovine kidney” (MDBK) e empregadas as estirpes citopatogênicas (CP) do BVDV 1 (Singer) e do BVDV 2 (VS-253), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria/RS.

2.4.3.1 Manutenção das culturas celulares

As células MDBK foram mantidas por cultura em monocamada em garrafas de poliestireno descartáveis para cultivo TPP[®], com área de 75 cm² (T₇₅) ou 150 cm² (T₁₅₀), em estufa a 37°C, utilizando meio de manutenção “Minimum Essential Medium” (Eagle-MEM) Gibco[®], filtrado, sem adição de antibióticos, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio e de 10% de soro fetal bovino (SFB) Cutilab[®] livre de *Pestivirus* e de anticorpos contra o BVDV.

Para a manutenção dessas culturas, eram realizados subcultivos a cada 72 horas, ocasião em que o meio de manutenção era descartado e a monocamada submetida ao tratamento com uma solução de tripsina-versene Difco[®], por um período de 2 a 3 minutos em estufa a 37°C, para promover o desprendimento do tapete celular e a individualização das células.

Após essa individualização, a solução de tripsina-versene era desprezada, e a ressuspensão celular feita pela adição do meio de manutenção Eagle-MEM contendo 10% de SFB. O volume final era determinado após a contagem das células em câmara de Neubauer, e os subcultivos feitos com concentração aproximada de 200.000 células/mL.

2.4.3.2 Multiplicação do vírus padrão

As amostras do BVDV 1 CP (estirpe Singer) e do BVDV 2 CP (estirpe VS-253) foram multiplicadas em células MDBK cultivadas em monocamada, utilizando-se garrafas de plástico descartáveis próprias para cultivo, com área de 25 cm² (T₂₅) e o meio de manutenção Eagle-MEM.

Para a multiplicação do vírus padrão era inoculado 1 mL da suspensão viral, do BVDV 1 ou do BVDV 2, nas garrafas com monocamada pré-formada 24 horas após a realização do subcultivo com 200.000 células/mL. Na inoculação, o meio de manutenção era removido e, depois da adição do inóculo, a garrafa permanecia em estufa a 37°C durante 60 minutos para ocorrer a adsorção do vírus às células. Durante

esse período, eram realizados pequenos movimentos na garrafa, a cada 10 minutos, para promover uma melhor adsorção do vírus ao tapete celular.

Transcorrido esse tempo, eram adicionados 5 mL do meio de manutenção Eagle-MEM com pH 7 e suplementado com 5% de SFB. Novamente a garrafa com o inóculo era submetida à incubação em estufa a 37°C até que o tapete celular apresentasse aproximadamente 90% de efeito citopatogênico (ECP). O intervalo compreendido entre a inoculação viral e a presença do ECP desejável variou de 36 a 48 horas.

Assim que a monocamada apresentava o ECP desejável, o inóculo era submetido ao congelamento a -20°C, seguido do rápido descongelamento para o rompimento das células e conseqüente liberação das partículas virais. O inóculo era então clarificado por centrifugação refrigerada (4°C) a 5.000 G durante 15 minutos para a decantação dos resíduos celulares. O sobrenadante contendo as partículas virais era distribuído no volume de 0,7 mL em criotubos com anel de vedação e armazenados no nitrogênio líquido a -196°C. Uma dessas alíquotas era submetida à titulação viral, e o cálculo das doses infectantes em cultura de tecidos 50% (TCID₅₀) resultante era considerado para todas as demais alíquotas desse mesmo inóculo.

2.4.3.3 Titulação viral

A titulação viral foi realizada em placas de microtitulação descartáveis de poliestireno cristal com 96 cavidades e fundo chato TPP®. Inicialmente, em banho de gelo, era diluído 0,5 mL da suspensão viral em 4,5 mL de meio de manutenção Eagle-MEM sem adição de SFB (diluição 10⁻¹), seguido posteriormente por diluições seriadas sucessivas até a diluição 10⁻⁸. Na placa de microtitulação eram adicionados, nas oito primeiras colunas, respectivamente das diluições 10⁻¹ a 10⁻⁸, 50 µL de cada diluição por cavidade, em oito repetições. As cavidades da coluna seguinte eram mantidas vazias (coluna divisória), e as últimas três colunas eram destinadas ao controle da suspensão celular, nas quais eram adicionados 50 µL de meio de manutenção Eagle-MEM sem SFB.

Realizada a distribuição das diluições virais, eram adicionados, em todas as cavidades da placa, com exceção das cavidades da coluna divisória, 50 µL de uma suspensão de células contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção Eagle-MEM com 10% de SFB. A placa era então incubada em estufa a 37°C com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ por 96 horas. Decorrido esse período, era feita a leitura do ECP, e o TCID₅₀ obtido pelo método de REED & MUENCH (1938).

2.4.3.4 Pesquisa de anticorpos neutralizantes

A pesquisa de anticorpos neutralizantes foi realizada pelo teste de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2 em todas as amostras de soro sanguíneo. As amostras foram testadas em duplicata, com diluições sucessivas da diluição 1:10 até a diluição 1:5.120.

As amostras de soro eram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas ao banho-maria a 56°C durante 30 minutos, para inativação do complemento. As reações eram realizadas em placas de microtitulação descartáveis de poliestireno cristal com 96 cavidades, e o meio de manutenção Eagle-MEM, acrescido de 1% de uma solução de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL) Gibco®, era utilizado para as diluições das amostras de soro.

A metodologia empregada consistiu dos seguintes procedimentos: nas cavidades da primeira coluna da placa, destinadas ao controle de suspensão celular, foram adicionados 100 µL de meio de manutenção Eagle-MEM; nas cavidades da segunda coluna, destinadas ao controle de toxicidade das amostras de soro testadas, foram adicionados 90 µL de meio de manutenção Eagle-MEM e 10 µL de cada soro teste, de tal forma que a diluição final do controle de toxicidade do soro era a mesma da primeira diluição testada (1:10).

Nas cavidades da terceira coluna foram adicionados 80 µL de meio de manutenção Eagle-MEM e 20 µL da amostra teste, obtendo-se a diluição inicial 1:5 do soro. Nas cavidades da quarta até a décima segunda coluna, que correspondia às demais diluições do soro, foram adicionados 50 µL de meio de manutenção Eagle-MEM em todas as cavidades das respectivas colunas. Da coluna 3, que apresentava um

volume de 100 μL em cada cavidade com diluição inicial 1:5, depois da homogeneização, foram retirados 50 μL por cavidade e adicionados nas cavidades da quarta coluna, procedimento que foi sucessivamente realizado até a décima segunda coluna, para a realização das diluições. Das cavidades da última coluna foram retirados 50 μL da diluição, e todas as cavidades correspondentes às diluições da amostra teste apresentavam o mesmo volume (50 μL).

Nas cavidades da terceira até a décima segunda coluna, que continham as diluições do soro, foram adicionados 50 μL da suspensão viral com 100 TCID₅₀ do BVDV. Nas cavidades das duas primeiras colunas, que eram destinadas ao controle de suspensão celular e ao controle de toxicidade do soro, não foi adicionada a suspensão viral. Após esta adição, as diluições finais das amostras de soro sanguíneo testadas passaram a corresponder às diluições 1:10 até 1:5.120, respectivamente da terceira até a décima segunda coluna. A placa foi então incubada por 60 minutos em estufa a 37°C com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂.

Terminado o tempo de incubação, foram adicionados em todas as cavidades da placa 50 μL de uma suspensão de células MDBK contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção Eagle-MEM com 10% de SFB. Em seguida, a placa foi novamente incubada em estufa a 37°C com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. Transcorridas 96 horas, foi feita a leitura da placa em microscópio óptico invertido, primeiramente verificando as cavidades do controle da suspensão celular e do controle de toxicidade do soro teste, para em seguida verificar a presença ou não de ECP nas outras cavidades referentes às diluições das referidas amostras.

Foram consideradas reagentes as amostras de soro sanguíneo que promoviam neutralização total de 100 TCID₅₀ do BVDV a partir da diluição 1:10. As amostras que não apresentaram ECP na última diluição testada, ou seja, na diluição 1:5.120, foram novamente submetidas ao teste de VN, porém diluídas até 1:20.480. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição em que foi verificada a neutralização viral, e o título final foi resultante da média geométrica dos títulos encontrados nas duplicatas.

2.4.3.5 Controle das TCID₅₀

Nas reações de VN foram também verificadas se as TCID₅₀ do BVDV estavam dentro do intervalo de validação do teste preconizado pelo “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals” (OIE, 2007), que é de 30 a 300 TCID₅₀. Inicialmente, para o preparo das 100 TCID₅₀ utilizadas na reação de VN, do valor apresentado na titulação viral foi subtraído o logaritmo de 100 TCID₅₀ (2,0) e do resultado dessa subtração foi obtido o antilogaritmo correspondente, que representava o volume final da diluição que conteria as 100 TCID₅₀.

A mesma diluição que definiu as 100 TCID₅₀ também foi utilizada na placa de validação da reação. A partir dela foram obtidas as diluições que definiram 1, 10 e 30 TCID₅₀. Para o preparo da diluição com 10 TCID₅₀, foi adicionado 0,2 mL da diluição de 100 TCID₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção Eagle-MEM, e para o preparo da diluição que definiu 1 TCID₅₀ foi diluído 0,2 mL da diluição de 10 TCID₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção Eagle-MEM. No cálculo de 30 TCID₅₀ foi diluído 0,6 mL de 100 TCID₅₀ em 1,4 mL de meio de manutenção Eagle-MEM.

Após o preparo das diluições, em uma placa de microtitulação com 96 cavidades, foram colocados 50 µL por cavidade nas quatro primeiras colunas em oito repetições, respectivamente das diluições 1, 10, 30 e 100 TCID₅₀. Nesta placa, a última coluna foi destinada ao controle de suspensão celular e não foi adicionado nenhum reagente na quinta e na décima primeira coluna, consistindo assim colunas limítrofes.

Em cada reação também eram realizados os mesmos procedimentos de titulação descritos no item 2.4.3.3, pois a suspensão viral era obtida a partir de uma das diluições (10^{-1} a 10^{-8}), e o título viral estabelecido era confirmado utilizando as cinco colunas que ainda restavam na placa.

Como o valor desse título já era previamente conhecido, e por questões de espaço na placa, foram utilizadas apenas as diluições com intervalos próximos ao título. Sendo assim, foram adicionados 50 µL de cada diluição por cavidade nas colunas correspondentes às diluições desejadas, com oito repetições. Transcorrido o período de incubação de 1 hora, pois esta placa era submetida aos mesmos intervalos de tempo

da reação de VN, foram adicionados, em todas as cavidades da placa, 50 µL da suspensão de células contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção Eagle-MEM com 10% de SFB.

A placa de validação foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ por 96 horas. A sua leitura era realizada antes das demais placas da reação de VN, pois os resultados nela encontrados validavam ou não o teste realizado.

2.4.4 Análise estatística

Os resultados encontrados nos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2, considerando todas as amostras analisadas, bem como as amostras provenientes somente de cada Estado, foram comparados pelo Teste de McNemar com intervalo de confiança de 95% (ZAR, 1999).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Teste de VN

Nos testes de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2, foram analisadas 260 amostras de soro sangüíneo de bovinos não vacinados provenientes de rebanhos dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo, das quais 102 (39,2%) foram reagentes ao BVDV. Considerando a faixa etária analisada, 73 (56,15%) das 130 amostras provenientes dos bovinos adultos e somente 29 (23,3%) das 130 amostras dos bovinos de 6 a 12 meses de idade foram reagentes ao BVDV.

Das 102 amostras reagentes ao BVDV, 81 (31,1%) reagiram tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, sete (2,7%) reagiram apenas ao BVDV 1 e 14 (5,4%) reagiram apenas ao BVDV 2. No total, 88 (33,8%) amostras foram reagentes ao BVDV 1 e 95 (36,5%), ao BVDV 2 (Tabela 1).

Nos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados em 60 amostras de soro sangüíneo provenientes do Estado de Minas Gerais, 36 (60%) foram reagentes ao BVDV. Dessas amostras, 30 (50%) reagiram tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, nenhuma foi reagente somente ao BVDV 1 e seis (10%) reagiram apenas ao BVDV 2. No total, 30 (40%) amostras foram reagentes ao BVDV 1 e 36 (60%) amostras reagentes ao BVDV 2 (Tabela 2).

Nos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados em 200 amostras de soro sangüíneo provenientes do Estado de São Paulo, 66 (33%) foram reagentes ao BVDV. Dessas amostras, 51 (25,5%) reagiram tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, sete (3,5%) reagiram apenas ao BVDV 1 e oito (4%) reagiram apenas ao BVDV 2. No total, 58 (29%) amostras foram reagentes ao BVDV 1 e 59 (29,5%) amostras reagentes ao BVDV 2 (Tabela 3).

Tabela 1. Comparação das reações de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizadas em amostras de soro sanguíneo de bovinos não vacinados contra o BVDV em rebanhos dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006

BVDV 1 (Singer)				
BVDV 2 (VS-253)		Reagentes	Não reagentes	Total
	Reagentes	81 (31,1%)	14 (5,4%)	95 (36,5%)
	Não reagentes	7 (2,7%)	158 (60,8%)	165 (63,5%)
	Total	88 (33,8%)	172 (66,2%)	260 (100%)

Tabela 2. Comparação das reações de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizadas em amostras de soro sanguíneo de bovinos não vacinados contra o BVDV em rebanhos do Estado de Minas Gerais no período de janeiro de 2005 a abril de 2006

BVDV 1 (Singer)				
BVDV 2 (VS-253)		Reagentes	Não reagentes	Total
	Reagentes	30 (50%)	6 (10%)	36 (60%)
	Não reagentes	0 (0%)	24 (40%)	24 (40%)
	Total	30 (50%)	30 (50%)	60 (100%)

Tabela 3. Comparação das reações de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizadas em amostras de soro sanguíneo de bovinos não vacinados contra o BVDV em rebanhos do Estado de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006

BVDV 1 (Singer)				
BVDV 2 (VS-253)		Reagentes	Não reagentes	Total
	Reagentes	51 (25,5%)	8 (4%)	59 (29,5%)
	Não reagentes	7 (3,5%)	134 (67%)	141 (70,5%)
	Total	58 (29%)	142 (71%)	200 (100%)

A distribuição das amostras reagentes por rebanho conforme o Estado analisado, a variação dos respectivos títulos médios de anticorpos contra o BVDV 1 e o BVDV 2, bem como os resultados encontrados nas diferentes faixas etárias estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5.

No Estado de Minas Gerais (Tabela 4), foi encontrado, em todos os rebanhos analisados, pelo menos um bovino reagente ao BVDV 1 ou ao BVDV 2. Na faixa etária dos bovinos adultos foram encontrados animais reagentes em todos os rebanhos, tanto para o BVDV 1 quanto para o BVDV 2. Para os bovinos na faixa etária de 6 a 12 meses, quatro rebanhos apresentaram animais reagentes ao BVDV 1 e cinco rebanhos ao BVDV 2. O número de animais reagentes ao BVDV 1 por rebanho variou de 1 a 8, e os títulos de anticorpos variaram de 10 a 2.560. Para o BVDV 2, o número de animais reagentes por rebanho variou de 1 a 8 e os títulos de anticorpos variaram de 14 a 3.620.

No Estado de São Paulo (Tabela 5), foi encontrado pelo menos um animal reagente em 17 rebanhos, quando testados para o BVDV 1, e em 18 rebanhos quando testados para o BVDV 2, do total de 20 rebanhos analisados. Na faixa etária dos bovinos adultos foram encontrados animais reagentes ao BVDV 1 em 17 rebanhos e, ao BVDV 2, em 18 rebanhos. Para os bovinos na faixa etária de 6 a 12 meses, seis rebanhos apresentaram animais reagentes ao BVDV 1 e cinco rebanhos ao BVDV 2. O número de animais reagentes ao BVDV 1 por rebanho variou de 1 a 9 e os títulos de anticorpos variaram de 10 a 2.560. Para o BVDV 2, o número de animais reagentes por rebanho variou de 1 a 8 e os títulos de anticorpos variaram de 10 a 905.

2.5.2 Análise estatística

Não foi verificada discordância na proporção de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 ($p>0,05$), considerando tanto a análise do total de amostras obtidas quanto a análise das amostras provenientes de cada Estado.

Tabela 4. Número de bovinos reagentes de acordo com a faixa etária, bem como a variação dos títulos de anticorpos nos testes de VN contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2, em rebanhos localizados no Estado de Minas Gerais no período de janeiro de 2005 a abril de 2006

Rebanho	Município	Nº total de animais/ rebanho	BVDV 1				BVDV 2			
			reagentes/ nº total de adultos	variação dos títulos anticorpos	reagentes/ nº total de bezerros	variação dos títulos anticorpos	reagentes/ nº total de adultos	variação dos títulos anticorpos	reagentes/ nº total de bezerros	variação dos títulos anticorpos
1	Machado	335	4/5	80 a 2.560	4/5	80 a 160	4/5	160 a 3.620	4/5	20 a 160
2	São Gonçalo do Sapucaí	480	3/5	160 a 640	4/5	40 a 320	3/5	20 a 640	5/5	40 a 3.620
3	São Gonçalo do Sapucaí	260	1/5	20	0/5	0	1/5	453	1/5	14
4	Poço Fundo	70	2/5	20 a 2.560	3/5	640 a 1.280	2/5	160 a 2.560	5/5	160 a 2.560
5	Poço Fundo	100	4/5	10 a 320	1/5	20	5/5	20 a 1.810	2/5	20 a 40
6	Machado	348	4/5	80 a 2.560	0/5	0	4/5	14 a 640	0/5	0

Tabela 5. Número de bovinos reagentes de acordo com a faixa etária, bem como a variação dos títulos de anticorpos nos testes de VN contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2, em rebanhos localizados no Estado de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006

Rebanho	Município	Nº total de animais/ rebanho	BVDV 1					BVDV 2				
			reagentes/ nº total de adultos	variação dos títulos anticorpos	reagentes/ nº total de bezerros	variação dos títulos anticorpos	reagentes/ nº total de adultos	variação dos títulos anticorpos	reagentes/ nº total de bezerros	variação dos títulos anticorpos		
7	S. J. do Rio Preto	150	2/5	10 a 320	1/5	10	4/5	10 a 120	0/5	0		
8	Jaboticabal	20	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0		
9	Sertãozinho	200	1/5	1.280	0/5	0	1/5	320	0/5	0		
10	São Carlos	120	2/5	10 a 20	0/5	0	3/5	10 a 80	0/5	0		
11	São Carlos	35	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0		
12	Jaboticabal	93	2/5	40 a 80	0/5	0	1/5	10	0/5	0		
13	Jaboticabal	136	2/5	10 a 20	0/5	0	2/5	10 a 20	0/5	0		
14	Guariba	87	3/5	160	0/5	0	3/5	80 a 160	0/5	0		
15	Guariba	148	2/5	80 a 640	0/5	0	2/5	20 a 240	0/5	0		
16	Guariba	30	4/5	40 a 2.560	1/5	10	3/5	80 a 905	0/5	0		
17	Pedregulho	92	5/5	80 a 320	4/5	10 a 1.280	5/5	56 a 120	3/5	10 a 80		
18	Pedregulho	101	1/5	20	0/5	0	1/5	40	0/5	0		
19	Cristais Paulista	122	2/5	320	0/5	0	2/5	160 a 196	0/5	0		
20	Buritizal	110	5/5	226 a 905	1/5	640	5/5	10 a 905	2/5	40 a 905		
21	Pedregulho	87	4/5	80 a 320	2/5	10 a 320	4/5	28 a 80	1/5	40		
22	Buritizal	108	2/5	40 a 320	0/5	0	2/5	80 a 226	1/5	10		
23	Buritizal	79	3/5	40 a 80	0/5	0	3/5	452	0/5	0		
24	Cristais Paulista	116	0/5	0	0/5	0	2/5	10 a 20	0/5	0		
25	Monte Alto	29	4/5	10 a 640	0/5	0	4/5	10 a 320	0/5	0		
26	Rifaina	23	4/5	40 a 1.280	1/5	10	4/5	10 a 320	1/5	28		

2.6 DISCUSSÃO

Na amostragem utilizada neste estudo, 39,2% dos bovinos foram reagentes ao BVDV. Porém, a metade das amostras analisadas foi proveniente de animais jovens com idade compreendida entre 6 e 12 meses. Considerando que entre 50% e 90% da população bovina adulta apresenta anticorpos (HOUE, 1999; KRAMPS et al., 1999; LINDBERG, 2002), e analisando apenas os resultados dos testes de VN contra o BVDV dos animais adultos, a quantidade de animais reagentes (56,15%) esteve no intervalo da estimativa esperada.

Correlacionando aos demais estudos de ocorrência realizados no Brasil, a porcentagem de bovinos adultos reagentes apresentou valor próximo àqueles encontrados em algumas pesquisas (PELLEGRIN et al., 1997; PITUCO & DEL FAVA, 1998; GUIMARÃES et al., 2001; DIAS & SAMARA, 2003; NORONHA et al., 2003; ALFAIA et al., 2004), que também utilizaram somente amostras oriundas de animais adultos.

A quantidade de bovinos reagentes nos rebanhos do Estado de Minas Gerais (Tabela 2) foi proporcionalmente maior do que no Estado de São Paulo (Tabela 3). Essa diferença poderia estar relacionada ao fato de que a maioria dos rebanhos analisados no Estado de Minas Gerais possuía maior número de animais e o regime de criação era mais intensivo, favorecendo a maior disseminação do BVDV (HOUE & MEYLING, 1991; HOUE, 1999; MOCKELIUNIENE et al., 2004).

Nos testes de VN para ambos os genótipos, das 102 amostras reagentes ao BVDV, 81 (31,1%) reagiram tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, porém sete (2,7%) reagiram apenas ao BVDV 1 e 14 (5,4%) reagiram apenas ao BVDV 2 (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por FLORES et al. (2000), com a detecção de 2,5% de amostras reagentes somente ao BVDV 1 e 3,3% de amostras reagentes apenas ao BVDV 2.

No total, 88 (33,8%) amostras foram reagentes ao BVDV 1 e 95 (36,5%) foram reagentes ao BVDV 2 (Tabela 1). Esses resultados demonstraram que a utilização de estirpes de apenas um genótipo nos testes de VN resultaria em diagnósticos falso-

negativos para o outro genótipo, de acordo com as observações realizadas por FLORES et al. (2000); FULTON et al. (2000); FULTON et al. (2002); CHASE et al. (2003); FLORES et al. (2005). Entretanto, pelo Teste de McNemar, não foram detectadas discordâncias entre a proporção de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2, quer seja na análise da totalidade das amostras, ou na análise específica das amostras provenientes de cada Estado.

A utilização de estirpes do BVDV 2 no teste de VN também seria necessária no caso da análise individual dos rebanhos, pois o rebanho 24, localizado no Estado de São Paulo (Tabela 5), seria diagnosticado como falso-negativo, já que o mesmo apresentou somente dois bovinos reagentes ao BVDV 2 e nenhum bovino reagente ao BVDV 1. Um outro aspecto também verificado foi que os maiores títulos de anticorpos nos testes de VN (3.620) foram encontrados nos bovinos reagentes ao BVDV 2, especificamente nos rebanhos 1 e 2 (Tabela 4).

Todos os rebanhos localizados no Estado de Minas Gerais apresentaram pelo menos um animal reagente ao BVDV. No Estado de São Paulo, com exceção dos rebanhos 8 e 11 (Tabela 5), nos demais rebanhos analisados também foi encontrado pelo menos um animal reagente, como nas pesquisas realizadas por RICHTZEINHAIN et al. (1999) e por DIAS & SAMARA (2003), demonstrando assim que, em algum momento, esses rebanhos sofreram a infecção pelo BVDV (NETTLETON & ENTRICAN, 1995).

A quantidade de bovinos adultos reagentes foi maior do que a quantidade de bovinos jovens reagentes. Segundo MOCKELIUNIENE et al. (2004), a quantidade de reagentes é maior à medida que a idade aumenta, sugerindo desta forma a ocorrência de infecções antigas, afinal os títulos de anticorpos contra o BVDV são de longa duração após a infecção natural (LINDBERG & HOUE, 2005), e o declínio desses pode ser observado somente alguns anos depois da ocorrência da infecção (FREDRIKSEN et al., 1999).

Muitos dos rebanhos analisados apresentaram bovinos com títulos altos de anticorpos. Entretanto, isso não é suficiente para predizer a presença do BVDV no rebanho. A característica dos anticorpos contra o BVDV serem de longa duração após a

infecção natural (FREDRIKSEN et al., 1999; LINDBERG & HOUE, 2005), consiste no desafio de detectar o verdadeiro estágio da infecção em que se encontra um rebanho (HOUE, 1999).

Em alguns dos rebanhos que possuíam bovinos reagentes com altos títulos de anticorpos, uma parcela desses animais era de bovinos na faixa etária de 6 a 12 meses. Esta situação pode ser verificada nos rebanhos 1, 2 e 4 (Tabela 4) e nos rebanhos 17, 20 e 21 (Tabela 5). Neste caso, a detecção de anticorpos neutralizantes nessa faixa etária, bem como os altos títulos de anticorpos detectados, são indicativos da infecção recente pelo BVDV e também sugestivos da provável presença da fonte de infecção no rebanho (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

2.7 CONCLUSÕES

- Demonstrou-se a ocorrência de bovinos com anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1 e o BVDV 2 nos Estados de Minas Gerais e São Paulo;
- Na maior parte dos rebanhos analisados foi detectado pelo menos um bovino reagente, revelando que o BVDV está disseminado nos rebanhos bovinos brasileiros;
- A utilização de estirpes apenas de um genótipo do BVDV nos testes de VN resultou em diagnósticos falso-negativos para o outro genótipo;
- Os anticorpos neutralizantes detectados nos bovinos jovens sugeriram a presença do BVDV em alguns dos rebanhos analisados.

2.8 REFERÊNCIAS

ALFAIA, B. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; CAIXETA, S. P. M. B.; ROCHA, W. V.; BRITO, W. M. E. D. Prevalence and risk factors associated with BVDV infection in adult and non-vaccinated bovines females from Goiás State, Brazil. **Virus Reviews and Research**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 127, 2004.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BIUK-RUDAN, N.; CVETNIC, S.; MADIC, J.; RUDAN, D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 5, p. 875-881, 1998.

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

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

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

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

DUONG, M. C.; ALENIUS, S.; HUONG, L. T. T.; BJÖRKMAN, C. Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. **The Veterinary Journal**, London, 2007. "in press". Disponível em: <http://www.ScienceDirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WXN-4N6Y5SK21&_cdi=7163&_user=972052&_orig=search&_coverDate=03%2F08%2F2007&_sk=999999999&view=&wchp=dGLbVzzzSkWW&md5=6c36a8c602e60d589a3e7f307bd3b1d0&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2008.

DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 31, n. 12, p. 815-820, 1990.

FLORES, E. F. Vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **O Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1-2, p. 3-9, 2003.

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

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S. A. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. **The Veterinary Record**, London, v. 144, n. 5, p. 111-114, 1999.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; BRIGGS, R. E.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; PURDY, C. W.; LOAN, R. W.; DUFF, G. C.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 66, n. 3, p. 181-190, 2002.

FULTON, R. W.; SALIKI, J. T.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; d'OFFAY, J. M.; HELMAN, R. G.; BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 12, n. 1, p. 33-38, 2000.

GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B.; MOENING, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 113-115, 2003.

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**, Goiânia, v. 2, n. 1, p. 35-40, 2001.

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

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

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 137-143, 2003.

HOUE, H. Risk assessment. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 2, p. 35-63.

HOUE, H.; MEYLING, A. Prevalence of bovine virus diarrhea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 9-16, 1991.

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

KRAMPS, J. A.; MAANEN, C. V.; WETERING, G. V.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 135-144, 1999.

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

LINDBERG, A. **Epidemiology and eradication of bovine viral diarrhoea virus infections**. 2002. 54 p. Tese – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2002. Disponível em: <<http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000246/01/ALfin0.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2004.

LINDBERG, A.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance control. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 55-73, 2005.

LUZZAGO, C.; PICCININI, R.; ZEPPONI, A.; ZECCONI, A. Study on prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in 29 Italian dairy herds with reproductive problems. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 247-252, 1999.

MELÉNDEZ, P.; DONOVAN, A. Herd-level ELISA seroprevalence of bovine viral diarrhea antibodies in bulk-tank milk in Chilean dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 237-241, 2003.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, 2004.

MOCKELIUNIENE, V.; SALOMSKAS, A.; MOCCKELIUNAS, R.; PETKEVICIUS, S. Prevalence and epidemiological features of bovine viral diarrhoea virus infection in Lithuania. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 51-57, 2004.

MOLES, C. L. P.; GAVALDÓN, D.; TORRES, B. J.; CISNEROS, P. M. A.; AGUIRRE, S. J.; ROJAS, S. N. Seroprevalencia simultánea de leptospirosis y tres enfermedades de importancia reproductiva en bovinos del Altiplano Central de la República Mexicana. **Revista de la Salud Animal**, La Habana, v. 24, n. 2, p. 106-110, 2002.

MUVAVARIRWA, P.; MUDENGE, D.; MOYO, D.; JAVANGWE, S. Detection of bovine-virus-diarrhoea-virus antibodies in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 62, n. 4, p. 241-244, 1995.

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

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

NUOTIO, L.; JUVONEN, M.; NEUVONEN, E.; SIHVONEN, L.; HUSU-KALLIO, J. Prevalence and geographic distribution of bovine viral diarrhoea (BVD) infection in Finland 1993-1997. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 231-235, 1999.

OIE. Office International des Épizooties. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Paris. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00132.htm>. Acesso em: 30 ago. 2007.

OLIVEIRA, L. G.; OLIVEIRA, E. A. S.; SILVA, L. H. T. Presença de *Pestivirus* e anticorpos contra *Pestivirus* em soros e cultivos celulares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 5, p. 513-521, 1996.

PAISLEY, L. G.; WELLS, S.; SCHMITT, B. J. Prevalence of bovine viral diarrhoea antibodies in 256 U.S. cow-calf operations: a survey. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, n. 8, p. 1.313-1.323, 1996.

PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; LEITE, R. C. Seropositivity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in zebu cows in the

Brazilian Pantanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 49, n. 3, p. 375-377, 1997.

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

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

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

RICHTZEINHAIN, L. J.; BARBARINI, O.; UMEHARA, O.; De GRACIA, A. S.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA, F.; SOARES, R. M. Diarreia viral 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**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 107-111, 1999.

SMITH, D. V.; GROTELUESCHEN, D. M. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 131-149, 2004.

STAHL, K.; RIVERA, H.; VAGSHOLM, I.; MORENO-LÓPES, J. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 193-202, 2002.

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

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

CAPÍTULO 3 - OCORRÊNCIA DE ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM REBANHOS BOVINOS NOS ESTADOS DE MINAS GERAIS E SÃO PAULO

RESUMO – A ocorrência de animais persistentemente infectados foi realizada em 26 rebanhos bovinos localizados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Foram obtidas inicialmente, de cada rebanho, cinco amostras de sangue de bezerros entre 6 e 12 meses de idade, também denominados bezerros sentinelas. Todas as amostras de soro sangüíneo foram submetidas aos testes de virusneutralização para o BVDV 1 e o BVDV 2. Os rebanhos foram selecionados quando pelo menos três das cinco amostras eram reagentes a um dos genótipos e apresentavam títulos de anticorpos superiores a 128. Em três rebanhos selecionados foram colhidas amostras pareadas de sangue de todos os animais do rebanho, com intervalo de 30 dias entre as colheitas, e todas essas amostras também foram submetidas aos testes de virusneutralização para o BVDV 1 e o BVDV 2. Nas amostras que não foram reagentes a pelo menos um dos genótipos, e naquelas provenientes de bovinos com menos de seis meses de idade, foi realizada a pesquisa do BVDV pela RT-PCR. O vírus foi detectado em quatro amostras obtidas das colheitas pareadas de dois animais provenientes de um rebanho localizado no Estado de Minas Gerais, portanto foram diagnosticados dois animais persistentemente infectados. Nos outros rebanhos, o BVDV não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

Palavras-chave: animais persistentemente infectados, bezerros sentinelas, BVDV 1, BVDV 2, RT-PCR, virusneutralização

3.1 INTRODUÇÃO

A persistência dos vírus depende da sua habilidade em atingir o equilíbrio dentro do organismo hospedeiro ou da sua resistência no meio ambiente. Para os vírus menos resistentes ao meio ambiente, a persistência no hospedeiro é fundamental para a sua sobrevivência. Essa interação requer que os vírus tornem-se tênues para seus hospedeiros, promovendo assim um equilíbrio entre a enfermidade, os efeitos patológicos e a replicação viral. As infecções sem citopatologia ocasionadas pelo biótipo não citopatogênico (NCP) e a evasão do sistema imune do hospedeiro são alguns dos fatores que garantem a persistência do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (BROCK, 2003).

A principal característica do BVDV é a capacidade de induzir infecção fetal persistente, sendo um aspecto único da patogenia do vírus. Este fenômeno consiste no mecanismo básico pelo qual o BVDV é mantido no rebanho bovino, refletindo-se numa importante consequência do ponto de vista epidemiológico: o nascimento de animais persistentemente infectados (PI).

Para o controle da diarreia viral bovina (BVD) é essencial a detecção do animal PI no rebanho. O diagnóstico desses animais com base somente em sinais característicos sugestivos não é real, pois muitos são saudáveis e não manifestam qualquer suspeita clínica. A análise da ocorrência de anticorpos em todos os animais do rebanho, complementada à pesquisa do vírus naqueles não reagentes, é uma das maneiras de detectar o animal PI, para que medidas concretas no controle da enfermidade possam ser adotadas.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

O principal fator na disseminação natural do BVDV é a existência de um animal PI. A infecção do feto bovino com o biótipo NCP antes do desenvolvimento da competência imunológica, isto é, até 125 dias de gestação, pode resultar na geração de um animal que apresenta uma infecção persistente pelo BVDV por toda sua vida. Nessa fase da gestação, o sistema imunológico do feto é imaturo e as proteínas virais são reconhecidas erroneamente como próprias. O animal PI torna-se imunologicamente tolerante ao BVDV, e por meio deste o vírus é mantido na população bovina (DUBOVI, 1998).

A geração de animais PI é mais freqüente quando a infecção fetal ocorre entre 30 e 90 dias de gestação. A infecção persistente pode ser estabelecida tanto pelo BVDV 1 quanto pelo BVDV 2 (LIEBLER-TENORIO, 2005) e está associada somente ao biótipo NCP do BVDV, porém é específica para a estirpe infectante. Embora sejam imunotolerantes ao BVDV, os animais PI são imunocompetentes a outros antígenos (BROCK, 1995) e desenvolvem resposta imunológica contra estirpes heterólogas do BVDV (BAKER, 1995).

O período do desenvolvimento da competência imunológica pode variar entre os fetos. Tanto é que SCHODER et al. (2004) relataram o nascimento de bezerras gêmeas, sendo uma PI e a outra não, demonstrando assim a possibilidade de diferenças no estágio de maturação do sistema imunológico desses animais no momento da infecção, independentemente do período gestacional.

A imunotolerância é o mecanismo pelo qual o BVDV mantém-se nos rebanhos por transmissão direta e indireta (BROCK, 2003). No aspecto epidemiológico, os bovinos PI são considerados a principal fonte de infecção porque eliminam por toda sua vida uma grande quantidade de vírus em secreções e excreções (HOUE, 1995). O BVDV está amplamente distribuído por todos os órgãos corporais do animal PI e por isso são liberadas constantemente grandes quantidades do vírus no meio ambiente (BROWNLIE, 1990).

A prevalência de bovinos PI nos rebanhos infectados pode variar de 0,5% a 2%, e nos bovinos jovens, pode ser até o dobro (HOUE, 1999). Além de apresentarem grande importância na manutenção do BVDV na natureza, os animais PI também são fontes de vírus das quais serão selecionadas variantes genéticas quando animais não PI forem infectados (BOLIN & GROOMS, 2004).

Para BROCK (2003), os animais PI representam aproximadamente 1% do rebanho bovino. Outras pesquisas encontraram prevalências desses animais em diferentes tipos de rebanhos ou segmentos analisados, tais como 0,17% em rebanhos de corte (WITTUM et al., 2001); 0,3% e 0,32% em bezerros (LONERAGAN et al., 2005; LARSON et al., 2005); 0,4% em bezerros leiteiros (FULTON et al., 2006); e 0,09% em bezerros de corte (O'CONNOR et al., 2007).

A taxa de letalidade dos bezerros PI é maior que 50% no primeiro ano de vida, principalmente porque muitos deles nascem prematuros (BAKER, 1987), fracos, letárgicos ou apresentam algum tipo de malformação congênita. Alguns bezerros morrem após poucos dias ou até mesmo algumas horas após o nascimento. Aqueles que sobrevivem podem apresentar atraso no crescimento e baixa resistência a outras enfermidades, advinda de alterações funcionais de linfócitos e neutrófilos, que causam a imunossupressão (BOLIN, 1990).

Muitos animais PI podem ser clinicamente saudáveis, embora a expectativa de vida seja baixa (HOUE, 1993), pois todos apresentam o risco de desenvolver a doença das mucosas (MD) (BROWNLIE, 1990). Alguns podem até alcançar a idade adulta, e caso isso ocorra com fêmeas PI, a sua progênie também será PI. Desta forma, famílias de animais PI podem desenvolver-se dentro do rebanho pela transmissão do vírus nos estágios iniciais de gestação (BAKER, 1987).

Na identificação laboratorial de animais PI, o BVDV pode ser pesquisado em qualquer fragmento tecidual, excreção, secreção, sangue total ou soro sanguíneo, já que o vírus é encontrado em todo o organismo e em grande quantidade (BROCK, 1995; SANDVIK, 1999; SALIKI & DUBOVI, 2004). O isolamento viral em cultivo de células é o teste padrão para o diagnóstico, e a melhor amostra é o sangue total, do qual o vírus é extraído da papa de leucócitos. O isolamento também pode ser realizado a partir de

soro sangüíneo, suabes, fezes, sêmen e tecidos linfóides de fetos abortados (SALIKI & DUBOVI, 2004).

A maioria das estirpes de BVDV isoladas pertence ao biótipo NCP. No entanto, o cultivo de células em que foi feita a inoculação da amostra deve ser submetido à detecção da presença de antígenos virais pelos testes de imunofluorescência direta ou imunoperoxidase para o diagnóstico do vírus (SANDVIK, 1999; SALIKI & DUBOVI, 2004; GOYAL, 2005).

A detecção de antígenos virais também pode ser realizada pelo ELISA de captura (SALIKI & DUBOVI, 2004; GOYAL, 2005) ou pela técnica de imunoistoquímica em tecidos fixados pela formalina, principalmente a partir de fragmentos da orelha de bezerros (“ear notch”) (THUR et al., 1996; BRODERSEN, 2004). Esta última técnica é amplamente utilizada em programas de controle do BVDV na Europa (LARSON, 2005).

A reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) é utilizada como método rotineiro para o diagnóstico do BVDV, por ser um método com alta sensibilidade e os resultados são obtidos mais rapidamente do que no isolamento viral (SALIKI & DUBOVI, 2004). Qualquer tipo de amostra, como leite, soro sangüíneo, urina, sangue total, suabes, pele e tecidos, pode ser utilizada na RT-PCR. Porém, é necessária a utilização de metodologias específicas para cada tipo de amostra (GOYAL, 2005).

A maioria dos protocolos de RT-PCR foi desenvolvida com base na detecção da região altamente conservada (5'UTR) do genoma do BVDV (GOYAL, 2005), e esses protocolos utilizam “primers” que amplificam a região 5'UTR, comum aos genótipos, ou são específicos para o BVDV 1 ou para o BVDV 2 (RIDPATH et al., 1994; RIDPATH & BOLIN, 1998). Outros formatos da reação também são utilizados, como a “nested” RT-nPCR e a PCR “multiplex” (GOYAL, 2005).

A confirmação de um animal PI somente pode ser realizada quando for feito o isolamento ou a detecção de antígenos do BVDV em duas amostras colhidas num intervalo de 3 a 4 semanas (BROCK, 1995; SANDVIK, 1999; LARSON et al., 2005). O vírus pode ser encontrado tanto no interior de leucócitos quanto livre no sangue, o que possibilita a utilização do soro sangüíneo como amostra biológica (BROCK et al., 2005).

As amostras de soro sangüíneo apresentam também vantagens na praticidade da colheita e na possibilidade de estocagem por tempo prolongado (PILZ et al., 2005).

Além disso, o BVDV apresenta alta estabilidade no soro sangüíneo e permanece viável após a inativação do complemento a 56°C, tanto que é o mais freqüente contaminante viral presente em soro fetal bovino (SFB) comercial (SALIKI et al., 1997). No soro sangüíneo de animais PI, estão presentes em torno de 10^5 partículas infecciosas do BVDV por mL (BOLIN, 1990).

No entanto, os anticorpos colostrais podem suprimir todos os vírus livres na corrente circulatória de bezerros PI com até seis meses de idade. Por isso, a pesquisa do BVDV nessas amostras pode apresentar resultados falso-negativos (BEZEK & MECHOR, 1992; DUBOVI, 1996). Em bezerros PI com menos de três meses de idade, os vírus livres no soro sangüíneo são rapidamente neutralizados pelos anticorpos colostrais (SALIKI et al., 1997; STOKSTAD & LOKEN, 2002). Segundo KELLING et al. (1990), o isolamento viral em bezerros PI somente pôde ser realizado após oito semanas de idade, quando houve o declínio dos títulos de anticorpos colostrais.

Alguns estudos fornecem estimativas de prevalência do BVDV e da presença de rebanhos infectados. Porém, é importante o conhecimento da definição de um rebanho infectado, pois a correta classificação de rebanhos verdadeiramente infectados ou não está relacionada à prevalência de animais com anticorpos neutralizantes, à incidência de novos animais infectados, à identificação de fatores de risco predisponentes e à quantificação dos efeitos da infecção pelo BVDV nos animais e na produção animal (HOUE, 2005).

Durante a investigação de problemas de saúde animal em populações, podem existir evidências de que animais dentro do rebanho estejam infectados com o BVDV. Entretanto, o vírus pode estar presente em muitos rebanhos sem gerar suspeita ao proprietário ou ao médico veterinário (HOUE & MEYLING, 1991).

Como a prevalência dos animais PI é baixa nos rebanhos, e os sinais clínicos não são suficientes para a caracterização destes animais, foram desenvolvidas estratégias de amostragem para o diagnóstico dos rebanhos infectados com o BVDV. A pesquisa sorológica pode ser utilizada para determinar a existência ou não de bovinos

PI nos rebanhos. Teoricamente, a presença de um bovino reagente num rebanho não vacinado é uma evidência suficiente que caracteriza a exposição da população ao BVDV (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

Na presença de um animal PI, a infecção pelo BVDV dissemina-se rapidamente para a maioria dos animais do rebanho, induzindo altos títulos de anticorpos neutralizantes, que persistem por muitos anos. Essa característica é utilizada para a identificação de rebanhos com animais PI, por meio da determinação de títulos de anticorpos em animais denominados sentinelas ou pela detecção de anticorpos no leite de conjunto (SEKI et al., 2006).

Entretanto, amostras de leite não estão disponíveis para vacas secas, novilhas, bezerros e rebanhos de corte (SEKI et al., 2006). A detecção de anticorpos em leite de conjunto pode ser utilizada para identificar rebanhos leiteiros expostos ao BVDV, desde que não utilizem a vacinação (PILLARS & GROOMS, 2002; DIAS & SAMARA, 2003).

As amostras de leite de conjunto podem também ser utilizadas para a pesquisa do BVDV pela técnica da RT-PCR. Comparado ao diagnóstico de anticorpos nessas mesmas amostras, a RT-PCR apresenta a vantagem na detecção do vírus circulante, ao contrário dos anticorpos, que poderiam ser resultantes de uma exposição antiga ao BVDV (RADWAN et al., 1995; DREW et al., 1999; KOZASA et al., 2005).

Na pesquisa realizada por KOZASA et al. (2005), foi possível detectar um animal PI no leite de conjunto proveniente de 150 bovinos. Os títulos de BVDV no leite de bovinos PI são maiores do que no soro sangüíneo, pois a presença de elementos celulares no leite é maior quando comparada à do soro sangüíneo. Além disso, quando o RNA é extraído das células somáticas do leite, são obtidos melhores resultados na RT-PCR do que quando a extração é feita do leite integral (RADWAN et al., 1995).

A pesquisa de anticorpos em bezerros é empregada na verificação do estado sanitário de um rebanho não vacinado contra o BVDV. Neste caso, os bezerros servem como sentinelas e mostram se a transmissão do vírus está ocorrendo dentro do rebanho. A vantagem desta estratégia é a eficiência do diagnóstico, já que a detecção de reagentes indica a transmissão do vírus envolvendo animais PI ou transitoriamente infectados (TI). Porém, a presença de anticorpos passivos de origem colostrar é um

desafio na interpretação dos resultados sorológicos, visto que a sua duração nos bezerros é muito variável (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

HOUE (1992) propôs um método para identificar rebanhos leiteiros com animais PI. Este método consistiu na análise sorológica de cinco bezerros não vacinados com idade entre 6 e 18 meses, baseando-se no fato de que a alta prevalência de bezerros reagentes forneceria uma evidência indireta da existência de pelo menos um animal PI no rebanho. Para esse autor, pode ser possível distinguir rebanhos com e sem animais PI utilizando amostras de sangue de poucos animais do rebanho.

Outra pesquisa, também realizada por HOUE (1994), verificou se a detecção de anticorpos contra o BVDV em 10 amostras de animais entre 8 e 18 meses de idade poderia ser utilizada como um método seguro para definir o estado sanitário para BVD em rebanhos leiteiros. O estudo confirmou que a investigação a partir de poucas amostras é um método seguro para prever a presença ou ausência de animais PI no rebanho, pois a maioria das amostras era reagente nos rebanhos altamente infectados, e em rebanhos com baixas taxas de prevalência, o número de amostras reagentes era menor ou igual a três.

Entretanto, existe um período transitório em que a estratégia de amostragem utilizando animais entre 8 e 18 meses de idade pode fornecer um resultado falso-negativo. Este período está compreendido entre a introdução da infecção no rebanho e o nascimento de animais PI, época em que poucos animais do rebanho estão infectados (HOUE, 1994).

Segundo PILLARS & GROOMS (2002), a pesquisa de anticorpos em amostras de cinco bezerros entre 6 e 12 meses de idade, não vacinados contra BVDV, é um método válido para a identificação de rebanhos leiteiros com animais PI, independentemente do número de animais existente no rebanho. O tamanho dessa amostragem foi obtido utilizando um programa estatístico que considerou a quantidade de rebanhos com animais PI igual à quantidade de rebanhos sem animais PI, conforme lógica de fatores de risco para qualquer infecção com o BVDV.

Na metodologia descrita pelos autores citados anteriormente, um rebanho foi considerado reagente quando três de cinco bezerros apresentaram títulos de anticorpos

neutralizantes superiores a 128 frente a um genótipo do vírus, já que as amostras eram submetidas à VN tanto para o BVDV 1 quanto para o BVDV 2. Por outro lado, quando três de cinco bezerros apresentavam títulos menores do que 64 para ambos os genótipos, o rebanho era classificado como negativo. A realização da sorologia nos animais dessa faixa etária não é comprometida pelos anticorpos de origem colostrar, pois estes já não são mais detectáveis após seis meses de idade.

O limiar de detecção dos rebanhos infectados obtido por PILLARS & GROOMS (2002) ficou prejudicado em dois dos 14 rebanhos analisados porque apresentaram resultado falso-negativo. Num deles foi identificado posteriormente um único animal PI. Na ocasião do teste, este animal estava com três meses de idade e não estaria disseminando o vírus, talvez porque os anticorpos colostrais tivessem neutralizado o vírus livre. No outro rebanho, coincidentemente três dos cinco bezerros analisados eram PI.

Esses mesmos autores também enfatizaram a necessidade da realização dos testes de VN tanto para BVDV 1 quanto para o BVDV 2, pois desses 14 rebanhos testados, 4 apresentaram animais reagentes somente ao BVDV 2 e, conseqüentemente, poderiam ser erroneamente classificados como negativos pela estratégia da amostragem, caso fosse empregado apenas o teste para o BVDV 1.

No entanto, a detecção de animais PI nos rebanhos pela metodologia proposta por PILLARS & GROOMS (2002) pode não ser eficiente desde que os animais selecionados apresentem baixos títulos de anticorpos. Além disso, deve ser considerada a circulação do BVDV no rebanho quando bezerros reagentes estiverem presentes, independentemente do título de anticorpos (SEKI et al., 2006).

Na pesquisa realizada por WALDNER & CAMPBELL (2005), o teste sorológico de uma pequena amostra de bezerros ou de animais adultos não foi suficiente para prever a presença de animais PI em rebanhos de corte. Entretanto, nesse estudo foram analisados bezerros lactentes, rebanhos que adotavam a vacinação dos bovinos adultos e não foram utilizadas amostras representativas dos grupos de animais.

A análise sorológica dos bezerros sentinelas poderia ser útil para rebanhos de corte, principalmente pelo fato da convivência direta entre bezerros e animais adultos.

Mas, para o estabelecimento da estratégia de amostragem nesses rebanhos, é necessário ainda definir qual a quantidade de animais que seria suficiente para prever a existência de um animal PI e qual título de anticorpos considerado limítrofe (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

A identificação e a remoção de bovinos PI são medidas essenciais para a prevenção e o controle da BVD (BROCK, 2003). Mesmo sendo baixa a prevalência desses animais nos rebanhos, a sua presença reflete-se num grande impacto econômico, mas o alto custo para a identificação, por meio de testes individuais, restringe bastante as alternativas de controle do BVDV (KENNEDY, 2006).

3.3 OBJETIVO

Pesquisar a ocorrência de animais PI pelo BVDV em rebanhos bovinos localizados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Triagem dos rebanhos

Foram colhidas amostras de sangue de cinco bovinos com idade entre 6 e 12 meses de cada rebanho pesquisado, com base na metodologia adotada por PILLARS & GROOMS (2002). As amostras foram provenientes de seis rebanhos localizados nos municípios de Machado, Poço Fundo e São Gonçalo do Sapucaí, no Estado de Minas Gerais, e de 20 rebanhos localizados nos municípios de Jaboticabal, Monte Alto, Sertãozinho, São Carlos, Guariba, Pedregulho, São José do Rio Preto, Cristais Paulista, Buritizal e Rifaina, no Estado de São Paulo, totalizando 26 rebanhos analisados.

Os rebanhos pesquisados não adotavam a prática de vacinação contra o BVDV, eram de exploração leiteira ou de corte, e o número total de bovinos nestes rebanhos variava de 20 a 480. As amostras de sangue foram colhidas por punção na veia jugular em tubos siliconizados contendo vácuo BD[®] ("vacutainer"), com agulhas 25x8mm específicas para esse tipo de colheita, durante o período compreendido entre os meses de janeiro de 2005 a abril de 2006.

Os procedimentos aplicados no processamento das amostras de sangue para a obtenção do soro sangüíneo, e para o armazenamento dessas amostras, estão descritos no item 2.4.2 do Capítulo 2.

3.4.2 Teste de virusneutralização - VN

Todas as amostras foram submetidas ao teste de VN para a pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2 (OIE, 2007). Para cada amostra de soro testada foram feitas duplicatas com diluições sucessivas da diluição 1:10 até a diluição 1:5.120, conforme o protocolo apresentado no Capítulo 2, item 2.4.3. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição em que foi verificada a neutralização viral, e o título final foi resultante da média geométrica dos títulos encontrados nas duplicatas.

3.4.3 Seleção dos rebanhos

Foram selecionados para a pesquisa os rebanhos em que pelo menos três dos cinco bovinos com 6 a 12 meses de idade eram reagentes ao BVDV e apresentavam títulos de anticorpos igual ou superior a 128, contra o BVDV 1 ou contra o BVDV 2 (PILLARS & GROOMS, 2002). Nos rebanhos selecionados foram colhidas amostras de sangue pareadas de todos os bovinos, com intervalo de 30 dias entre as colheitas. Essas amostras foram submetidas ao teste de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2, em duplicata e com diluições sucessivas do soro sangüíneo de 1:10 até 1:5.120. As amostras pareadas de soro sangüíneo de cada bovino foram examinadas numa mesma placa de microtitulação, quando testadas para o BVDV 1 e para o BVDV 2.

3.4.4 Pesquisa de bovinos PI

O BVDV foi pesquisado nas amostras de soro sangüíneo pareadas que não foram reagentes em pelo menos um dos testes, contra o BVDV 1 ou contra o BVDV 2, e em todas as amostras de bovinos com idade inferior a seis meses, reagentes ou não reagentes. O teste diagnóstico empregado foi a RT-PCR, utilizando o protocolo de PILZ et al. (2005) com algumas modificações. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina – UEL – Londrina, Estado do Paraná.

3.4.5 Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa - RT-PCR

3.4.5.1 Extração do ácido nucléico

A extração do RNA foi realizada segundo a metodologia preconizada por BOOM et al. (1990), com a utilização de partículas de sílica e isotiocianato de guanidina para a purificação de ácidos nucléicos. Inicialmente, as amostras de soro sangüíneo foram

descongeladas à temperatura ambiente por 30 minutos. Depois de homogeneizadas, foram retirados de cada amostra 500 µL do soro e colocados em microtubos de 1.500µL Axygen® livres de DNase e RNase. Em cada microtubo foram adicionados 1.000 µL de uma solução tampão contendo isotiocianato de guanidina Invitrogen®, tris-HCl (pH 6,4), EDTA (pH 8,0) e “Octyl Phenol Ethoxylate” JT Baker®. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e submetidas à agitação mecânica por 10 minutos.

Transcorrido esse período, em cada amostra foram adicionados 30 µL de sílica Sigma® hidratada (pH 2,0), que foram homogeneizadas em vórtex e submetidas à agitação mecânica por 30 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 3.000 G por 2 minutos, a fase aquosa foi desprezada em solução de NaOH 10M, e o precipitado preservado.

Neste precipitado foram adicionados 500 µL de uma outra solução tampão contendo isotiocianato de guanidina e tris-HCl (pH 6,4), seguidos pela homogeneização em vórtex e centrifugação a 3.000 G por 2 minutos. Novamente o precipitado foi preservado, e a fase aquosa desprezada em solução de NaOH 10M. Esta etapa foi realizada por 2 vezes, utilizando o mesmo volume da solução tampão.

No procedimento seguinte, ao precipitado foram adicionados 1.000 µL de etanol 70% JT Baker® conservado a -20°C. Realizada a adição, as amostras foram homogeneizadas em vórtex, seguida pela centrifugação a 3.000 G por 2 minutos. A fase aquosa foi desprezada, e esta etapa também realizada por duas vezes com o mesmo volume de etanol.

Terminados os tratamentos com o etanol, foram adicionados ao precipitado 1.000 µL de acetona PA JT Baker®, que também estava conservada a -20°C, seguidos pela homogeneização em vórtex e centrifugação a 3.000 G por 2 minutos. Ao final deste tratamento, o sobrenadante foi desprezado.

O precipitado foi colocado em termobloco a 70°C por 1 minuto em câmara de exaustão. Depois de seco, foi ressuspendido em 50 µL de água DEPC Invitrogen®, homogeneizado em vórtex e submetido ao banho-maria a 56°C por 15 minutos. Transcorrido esse tempo, as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex e

centrifugadas por 5 minutos a 3.000 G. A fase aquosa contendo o RNA eluído foi retirada e armazenada a -20°C em microtubos livres de RNase e DNase.

Tais procedimentos também foram utilizados para a extração do ácido nucléico dos controles positivos, no caso as estirpes Singer do BVDV 1 e VS-253 do BVDV 2, que foram as mesmas estirpes utilizadas nas reações de VN.

3.4.5.2 Oligonucleotídeos iniciadores – “primers”

A RT-PCR foi realizada utilizando os “primers” 103 “sense” (5'TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC 3' - posição genômica 103-124) e 372 “anti-sense” (5'ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3' – posição genômica 372-392), desenhados a partir da sequência da região não traduzida (5'UTR) do genoma viral do BVDV 1a NADL, que amplifica um produto de 290 pares de base (pb) e compartilha homologia máxima entre o BVDV 1 e o BVDV 2 (WEINSTOCK et al., 2001).

3.4.5.3 Transcrição reversa - RT

As amostras contendo o RNA extraído foram inicialmente centrifugadas por 1 minuto a 2.000 G para a precipitação de todo resíduo de sílica presente. De cada amostra foram retirados 9 µL da suspensão contendo o RNA e adicionados em microtubos livres de DNase e RNase, seguidos pela adição de 3 µL do “mix” de desnaturação, que continha 2 µL de água ultrapura autoclavada e 1 µL do “primer anti-sense” 372 (20 pmol). O RNA e o “mix” foram homogeneizados em vórtex, centrifugados a 2.000 G por 1 minuto e colocados no termociclador para a realização da desnaturação do RNA num ciclo a 97°C por 5 minutos.

Transcorrido esse tempo, as amostras foram rapidamente retiradas do termociclador e colocadas em banho de gelo para o choque térmico. Decorridos 5 minutos, em cada amostra foram adicionados 8 µL do “mix” RT contendo 3,1 µL de água ultrapura autoclavada, 2 µL de tampão PCR “buffer” 10x Invitrogen® (200 mM tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 2 µL de dNTP Invitrogen® (0,25 mM de cada dNTP), 0,6 µL

de MgCl_2 Invitrogen® (1,5 mM) e 0,3 μL da enzima transcriptase reversa M-MLV-RT (60 unidades) Invitrogen®, perfazendo assim um volume final de 20 μL .

O RNA desnaturado e o “mix” RT foram homogeneizados em vórtex e centrifugados a 2.000 G por 1 minuto. A síntese do cDNA foi realizada no termociclador numa etapa a 42°C por 30 minutos, seguido por uma etapa de 5 minutos a 95°C para a inativação da enzima M-MLV-RT.

3.4.5.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A PCR foi realizada em microtubos livres de DNase e RNase a partir da mistura de 5 μL do cDNA obtido na RT e 45 μL do “mix” PCR constituído por 34 μL de água ultrapura autoclavada, 5 μL de tampão PCR “buffer” 10x (200 mM tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 2 μL de dNTP (0,25 mM de cada dNTP), 1,5 μL de MgCl_2 (1,5 mM), 1,0 μL do “primer sense” 103 (20 pmol), 1,0 μL do “primer anti-sense” 372 (20 pmol) e 0,5 μL (2,5 unidades) da enzima “Taq Platinum DNA polymerase” Invitrogen®, totalizando um volume final de 50 μL por amostra.

As amostras de cDNA juntamente com o “mix” PCR foram homogeneizados em vórtex, centrifugadas a 2.000 G por 1 minuto e colocados no termociclador. A PCR foi realizada numa etapa a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 59°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão); e um ciclo a 72°C por 7 minutos (extensão final).

Terminada a reação, os produtos foram imediatamente submetidos à análise pela eletroforese em gel de agarose 2% ou mantidos a -20°C até o momento de serem analisados.

3.4.5.5 Análise dos produtos da RT-PCR

Os produtos da PCR foram analisados pela eletroforese em gel de agarose Invitrogen® a 2% com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Para cada amostra, foram utilizados 8 μL do produto da PCR e 2 μL de tampão de corrida, perfazendo um volume

final de 10 μ L. Em cada gel foram reservadas duas canaletas para os controles positivos (BVDV 1 e BVDV 2), aplicados no mesmo volume das amostras, e uma canaleta para o controle negativo (água ultrapura autoclavada).

O gel contendo os produtos de PCR foi colocado na câmara de eletroforese em tampão TBE pH 8,4 (89 mM tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (100V) durante aproximadamente 60 minutos. Transcorrido esse período, o gel foi visualizado em um aparelho fotodocumentador BioRad[®] sob luz ultravioleta e fotodocumentado em sistema digital “Electrophoresis Documentation and Analysis System” 290, KODAK[®]. As fotografias dos géis foram analisadas no programa Adobe Photoshop[®].

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Rebanhos selecionados

Nos testes de VN realizados em cinco amostras de soro sangüíneo de bovinos com 6 a 12 meses de idade em 26 rebanhos localizados nos Estados de Minas Gerais e de São Paulo, nove rebanhos (1, 2, 4, 5, 7, 16, 17, 20 e 21) apresentaram bovinos reagentes ao BVDV 1 (Singer) (Tabela 6). Desse total, quatro rebanhos (5, 7, 16 e 20) apresentaram apenas um bovino reagente, um rebanho (21) apresentou dois bovinos reagentes, um rebanho (4) apresentou três bovinos reagentes e três rebanhos (1, 2 e 17) apresentaram quatro bovinos reagentes.

Para o BVDV 2 (VS-253), também foram encontrados bovinos reagentes no teste de VN em nove rebanhos (1, 2, 3, 4, 5, 17, 20, 21 e 22) (Tabela 6). Desse total, três rebanhos (3, 21 e 22) apresentaram apenas um bovino reagente, dois rebanhos (5 e 20) apresentaram dois bovinos reagentes, um rebanho (17) apresentou três bovinos reagentes, um rebanho (1) apresentou quatro bovinos reagentes e dois rebanhos (2 e 4) apresentaram cinco bovinos reagentes.

Os rebanhos 1, 2, 4, 5, 17, 20 e 21 possuíam bovinos reagentes tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2. Nos rebanhos 7 e 16 foram encontrados bovinos reagentes apenas ao BVDV 1, e nos rebanhos 3 e 22, apenas ao BVDV 2.

Foram selecionados para a pesquisa os rebanhos dos quais pelo menos três dos cinco bovinos foram reagentes ao BVDV 1 ou ao BVDV 2 e apresentavam títulos de anticorpos igual ou maior a 128 (PILLARS & GROOMS, 2002). Sendo assim, quatro rebanhos foram selecionados, pois possuíam bovinos reagentes dentro desses parâmetros. Os rebanhos 1 e 17 apresentaram essa condição quando testados para o BVDV 1, o rebanho 2 para o BVDV 2, e o rebanho 4 apresentou resultados dentro dos parâmetros adotados tanto para o BVDV 1 quanto para o BVDV 2.

3.5.2 Colheita das amostras pareadas

Dos rebanhos selecionados, foram colhidas amostras pareadas de todos os bovinos nos rebanhos 1 e 4, localizados no Estado de Minas Gerais, e no rebanho 17, localizado no Estado de São Paulo. No rebanho 2 não foi possível a realização das colheitas porque o proprietário não concedeu a autorização. No total foram colhidas 1.005 amostras de soro sangüíneo referentes às duas colheitas realizadas, sendo 669 amostras pertencentes a 341 bovinos do rebanho 1, 148 amostras pertencentes a 76 bovinos do rebanho 4 e 188 amostras pertencentes a 95 bovinos do rebanho 17. Em alguns bovinos não foi possível a colheita de amostras pareadas, pois na ocasião da 2ª colheita haviam sido descartados ou tinham morrido. Por outro lado, foram obtidas amostras apenas na 2ª colheita daqueles que tinham nascido no intervalo entre as colheitas.

Tabela 6. Resultados dos testes de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2, com os respectivos títulos de anticorpos das amostras reagentes, realizados no soro sanguíneo de bovinos com 6 a 12 meses de idade provenientes de rebanhos localizados nos Estados de Minas Gerais e de São Paulo no período de janeiro de 2005 a abril de 2006

Identificação			Virusneutralização									
			BVDV 1 - estirpe Singer					BVDV 2 - estirpe VS-253				
			Amostras					Amostras				
Rebanho	Localização	Estado	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	Machado	MG	160	160	nr	80	320	80	60	nr	160	20
2	S. G. do Sapucaí	MG	40	40	320	nr	80	320	40	3.840	80	226
3	S. G. do Sapucaí	MG	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	14	nr
4	Poço Fundo	MG	80	640	1810	640	640	160	1.280	2.560	1.810	1.280
5	Poço Fundo	MG	nr	nr	nr	20	Nr	nr	nr	20	40	nr
6	Machado	MG	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
7	S. J. do Rio Preto	SP	nr	nr	10	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
8	Jaboticabal	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
9	Sertãozinho	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
10	São Carlos	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
11	São Carlos	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
12	Jaboticabal	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
13	Jaboticabal	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
14	Guariba	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
15	Guariba	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
16	Guariba	SP	10	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
17	Pedregulho	SP	640	20	226	nr	640	80	nr	10	nr	80
18	Pedregulho	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
19	Cristais Paulista	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
20	Buritizal	SP	nr	nr	nr	640	Nr	nr	nr	40	905	nr
21	Pedregulho	SP	nr	320	nr	nr	10	nr	40	nr	nr	nr
22	Buritizal	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	10	nr
23	Buritizal	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
24	Cristais Paulista	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
25	Monte Alto	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr
26	Rifaina	SP	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nr	nr

* nr – bovino não reagente

3.5.3 Teste de VN - amostras pareadas

3.5.3.1 Rebanho 1

A porcentagem de bovinos reagentes na VN ao BVDV 1 na 1^a colheita foi 83,63% (281/336) e na 2^a colheita foi 81,68% (272/333). Para o BVDV 2, a porcentagem de bovinos reagentes na 1^a colheita foi 82,74% (278/336) e na 2^a colheita foi 79,28% (264/333). Os títulos de anticorpos dos bovinos reagentes nas colheitas variaram de 10 a 5.120, tanto para o BVDV 1 quanto para o BVDV 2.

Entre 341 bovinos analisados, para o BVDV 1, 262 bovinos foram reagentes e 49 não foram reagentes nas duas colheitas, 12 foram reagentes apenas na 1^a colheita, cinco apenas na 2^a colheita, e dos 13 bovinos dos quais não foram colhidas amostras pareadas, somente um não foi reagente. Para o BVDV 2, 252 bovinos foram reagentes e 58 não foram reagentes nas duas colheitas, 15 foram reagentes apenas na 1^a colheita, três apenas na 2^a colheita, e também dos 13 bovinos dos quais não foram colhidas amostras pareadas, somente um não foi reagente (Tabela 7).

Nos 262 bovinos reagentes nas colheitas pareadas para o BVDV 1, 16 tinham menos que seis meses de idade. De 12 reagentes apenas na 1^a colheita, sete também tinham menos que seis meses de idade e dos cinco bovinos que foram reagentes apenas na 2^a colheita, todos tinham mais que seis meses de idade. No teste para o BVDV 2, de 252 bovinos reagentes nas colheitas pareadas, 16 tinham menos que seis meses de idade, e de 15 reagentes apenas na 1^a colheita, sete tinham menos que seis meses de idade. Todos os três bovinos reagentes apenas na 2^a colheita tinham mais que seis meses de idade.

Tabela 7. Número total de bovinos analisados pela VN para o BVDV 1 e o BVDV 2; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas pareadas; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas não pareadas no rebanho 1

Amostras		BVDV 1	BVDV 2
		Bovinos (n)	Bovinos (n)
Pareadas	Reagentes na 1ª e 2ª colheitas	262	252
	Não reagentes na 1ª e 2ª colheitas	49	58
	Reagentes na 1ª e não reagentes na 2ª colheita	12	15
	Não reagentes na 1ª e reagentes na 2ª colheita	05	03
Não pareadas	Reagentes na 1ª colheita	07	07
	Não reagentes na 1ª colheita	01	01
	Reagentes na 2ª colheita	05	05
	Não reagentes na 2ª colheita	00	00
Total		341	341

3.5.3.2 Rebanho 4

A porcentagem de bovinos reagentes na VN para o BVDV 1 na 1ª colheita foi 94,44% (68/72) e na 2ª colheita foi 96,05% (73/76). Os títulos de anticorpos dos bovinos reagentes na 1ª colheita variaram de 14 a 5.120, enquanto na 2ª colheita variaram de 28 a 5.120. Para o BVDV 2, as porcentagens de bovinos reagentes na 1ª e 2ª colheitas foram semelhantes ao BVDV 1, ou seja, 95,77% (68/72) na 1ª colheita, com títulos de anticorpos que variaram de 20 a 5.120, e 96,05% (973/76) na 2ª colheita, com títulos de anticorpos compreendidos entre 40 e 5.120.

Os resultados encontrados tanto para o BVDV 1 quanto para o BVDV 2 foram semelhantes. Dos 76 bovinos analisados, três não foram reagentes nas amostras pareadas (1ª e 2ª colheitas) e somente um bovino com mais de seis meses de idade não foi reagente na 1ª colheita, mas apresentou na 2ª colheita títulos de anticorpos 453 para o BVDV 1 e 640 para o BVDV 2. Nas amostras não pareadas todos os animais foram reagentes (Tabela 8).

Nos testes de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2 realizados nas amostras das colheitas pareadas, cinco bovinos reagentes e dois não reagentes tinham menos que seis meses de idade. No entanto, na 2^a colheita, foram obtidas amostras de quatro bovinos nascidos no intervalo entre a 1^a e 2^a colheitas e que no teste de VN eram reagentes, apresentando títulos de anticorpos de 80 até 5.120.

Tabela 8. Número total de bovinos analisados pela VN para o BVDV 1 e o BVDV 2; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas pareadas; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas não pareadas no rebanho 4

Amostras		BVDV 1	BVDV 2
		Bovinos (n)	Bovinos (n)
Pareadas	Reagentes na 1 ^a e 2 ^a colheitas	68	68
	Não reagentes na 1 ^a e 2 ^a colheitas	03	03
	Reagentes na 1 ^a e não reagentes na 2 ^a colheita	00	00
	Não reagentes na 1 ^a e reagentes na 2 ^a colheita	01	01
Não pareadas	Reagentes na 1 ^a colheita	00	00
	Não reagentes na 1 ^a colheita	00	00
	Reagentes na 2 ^a colheita	04	04
	Não reagentes na 2 ^a colheita	00	00
Total		76	76

3.5.3.3 Rebanho 17

A porcentagem de animais reagentes para o BVDV 1 foi 71,28% (67/94) na 1^a colheita e 72,34% (68/94) na 2^a colheita. Os títulos de anticorpos dos animais reagentes na 1^a colheita variaram de 10 a 2.560, enquanto na 2^a colheita variaram de 10 a 905. Para o BVDV 2, foram reagentes 75,53% (71/94) das amostras na 1^a colheita e 73,40% (69/94) na 2^a colheita, e os títulos de anticorpos dos animais reagentes nas duas colheitas variaram de 10 a 453.

Do total de 95 bovinos analisados, para o BVDV 1, 65 bovinos foram reagentes e 25 não foram reagentes nas colheitas pareadas, apenas um bovino foi reagente na 1ª colheita, dois bovinos foram reagentes na 2ª colheita e as duas amostras não pareadas foram reagentes. No teste para o BVDV 2, foram reagentes 67 bovinos e 22 não foram reagentes nas colheitas pareadas, três foram reagentes apenas na 1ª colheita e somente um bovino foi reagente na 2ª colheita. As duas amostras não pareadas também foram reagentes para o BVDV 2 (Tabela 9).

Nos bovinos reagentes nas colheitas pareadas para o BVDV 1, quatro tinham menos que seis meses de idade, assim como o único bovino que foi reagente apenas na 1ª colheita e um dos dois bovinos reagentes somente na 2ª colheita. No teste para o BVDV 2, quatro bovinos reagentes nas colheitas pareadas, um dos três bovinos reagentes apenas na 1ª colheita, bem como o único reagente apenas na 2ª colheita tinham menos que seis meses de idade. Das amostras não pareadas reagentes, somente um era proveniente de um bezerro que havia nascido entre as colheitas.

Tabela 9. Número total de bovinos analisados pela VN para o BVDV 1 e o BVDV 2; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas pareadas; número de bovinos reagentes e não reagentes nas colheitas não pareadas no rebanho 17

Amostras		BVDV 1	BVDV 2
		Bovinos (n)	Bovinos (n)
Pareadas	Reagentes na 1ª e 2ª colheitas	65	67
	Não reagentes na 1ª e 2ª colheitas	25	22
	Reagentes na 1ª e não reagentes na 2ª colheita	01	03
	Não reagentes na 1ª e reagentes na 2ª colheita	02	01
Não pareadas	Reagentes na 1ª colheita	01	01
	Não reagentes na 1ª colheita	00	00
	Reagentes na 2ª colheita	01	01
	Não reagentes na 2ª colheita	00	00
Total		95	95

3.5.4 RT - PCR

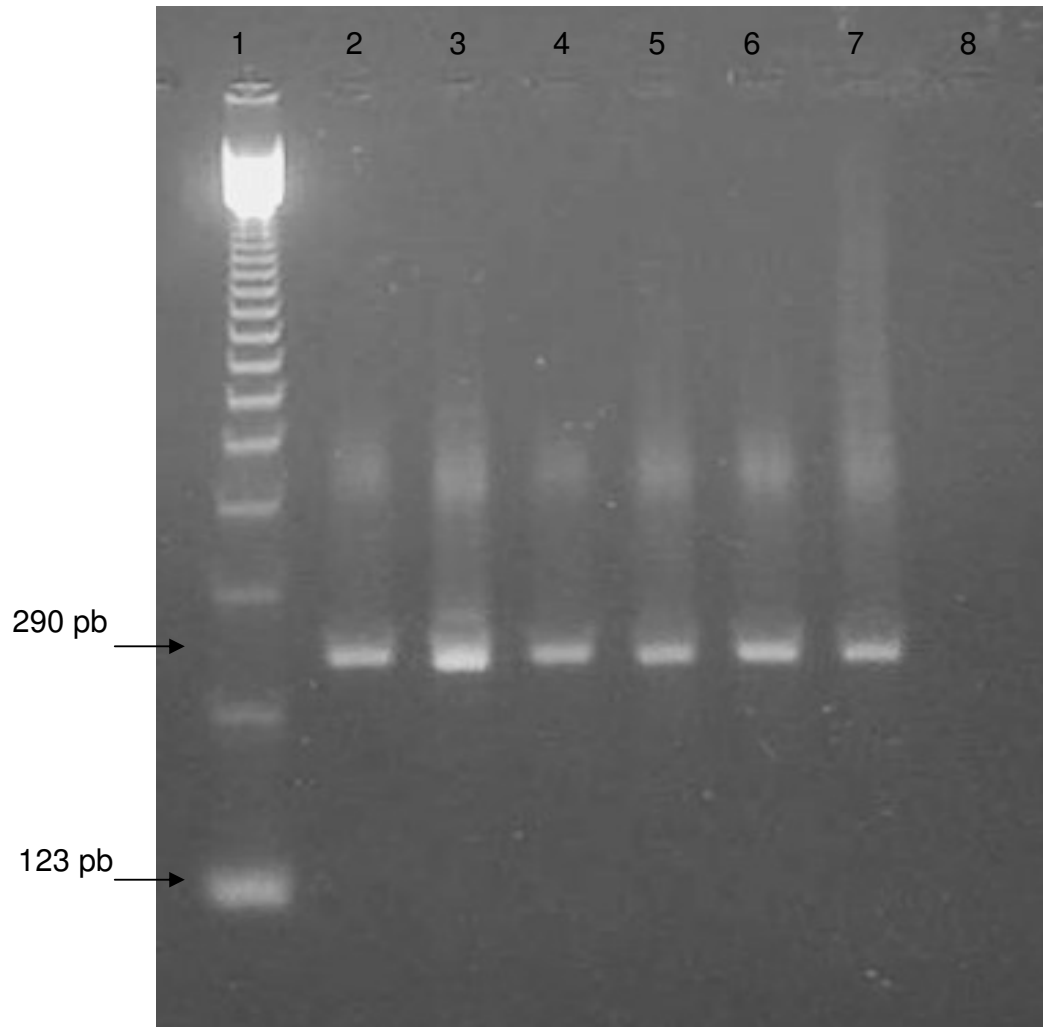
A RT-PCR foi realizada nas amostras de soro sangüíneo pareadas não reagentes, nas amostras pareadas em que pelo menos uma delas não foi reagente ao BVDV 1 ou ao BVDV 2, assim como nas amostras não pareadas que não foram reagentes, adotando o mesmo critério mencionado anteriormente. Foram também submetidas à pesquisa do BVDV as amostras reagentes ou não reagentes de todos os bovinos com menos de seis meses de idade (Tabela 10).

A maioria das amostras dos três rebanhos pesquisados que não foram reagentes ao BVDV 1 também não foram reagentes ao BVDV 2. Desta maneira, foram analisadas 277 amostras de soro sangüíneo, sendo 184 amostras provenientes do rebanho 1, 21 amostras do rebanho 4 e 72 do rebanho 17 (Tabela 10).

A análise pela RT-PCR resultou na amplificação de produtos com 290 pb em quatro amostras provenientes das colheitas pareadas de dois bovinos do rebanho 4 (amostras 04/58 A, 04/58 B, 04/72 A, 04/72 B) (Figura 1). Essas amostras eram de animais com idade inferior a seis meses e não foram reagentes ao BVDV 1 e nem ao BVDV 2 na VN. Nos rebanhos 1 e 17 não foram detectadas amostras com a amplificação de produtos com 290 pb na RT-PCR.

Tabela 10. Número total de amostras não reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 nos testes de VN; amostras não reagentes apenas ao BVDV 1; amostras não reagentes apenas ao BVDV 2; e amostras de bovinos com menos de seis meses de idade, analisadas pela RT-PCR para a detecção do BVDV

Amostras	Rebanho 1	Rebanho 4	Rebanho 17	Total
	Amostras (n)	Amostras (n)	Amostras (n)	Amostras (n)
Não reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2	68	03	32	103
Não reagentes ao BVDV 1	12	00	13	25
Não reagentes ao BVDV 2	23	00	08	31
Bovinos com menos de seis meses de idade	81	18	19	118
Total	184	21	72	277



Legenda: canaleta 1 – DNA “ladder” 123 pb Invitrogen[®]
canaleta 2 – estirpe citopatogênica BVDV 1 Singer
canaleta 3 – estirpe citopatogênica BVDV 2 VS-253
canaleta 4 – amostra 04/58 A
canaleta 5 – amostra 04/58 B
canaleta 6 – amostra 04/72 A
canaleta 7 – amostra 04/72 B
canaleta 8 – controle negativo (água ultrapura autoclavada)

Figura 1. Análise para a detecção do BVDV, por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, dos produtos (290 pb) amplificados pela RT-PCR em amostras pareadas de soro sangüíneo do rebanho 4

3.6 DISCUSSÃO

A análise pela RT-PCR resultou na detecção do genoma do BVDV em quatro amostras provenientes das colheitas pareadas de dois bovinos do rebanho 4, localizado no Estado de Minas Gerais. Essas amostras eram de animais com menos de seis meses de idade e na VN não tinham sido reagentes ao BVDV 1 e nem ao BVDV 2, caracterizando assim dois animais PI, pois a confirmação destes animais somente é realizada pela detecção do vírus em amostras pareadas colhidas no intervalo entre 3 e 4 semanas (BROCK, 1995; SANDVICK, 1999).

Entre 26 rebanhos, foram detectados animais PI em apenas um deles. A diferente condição existente nas infecções pelo BVDV, na qual a presença de animais reagentes não significa a presença do vírus num rebanho, e a baixa prevalência dos animais PI nos rebanhos infectados, torna difícil a detecção dos rebanhos verdadeiramente infectados (HOUE, 1995; SMITH & GROTELUESCHEN, 2004). No entanto, neste estudo, os rebanhos foram submetidos à amostragem sem levar em consideração a suspeita ou não da presença da BVD, e somente em três desses rebanhos foi realizada a pesquisa de animais PI em todos os animais.

Na ocasião da colheita das amostras pareadas no rebanho 4, o número total de bovinos existentes era 76. Como nesse rebanho foram detectados dois animais PI, a prevalência desses animais foi 2,63%. Esse resultado está inserido no intervalo de prevalência de animais PI proposto por (HOUE, 1995), entre 0,5% e 2%, que pode ser até duas vezes maior quando eles são detectados nos animais jovens. É nessa última condição que se insere a prevalência encontrada, pois os animais PI detectados tinham idade inferior a seis meses.

Quando todos os bovinos do rebanho 4 foram submetidos às colheitas de sangue pareadas, os animais PI tinham entre 4 e 5 meses de idade, eram bezerros saudáveis e não apresentavam diferenças dos demais bovinos da mesma faixa etária (HOUE, 1993). Porém, um desses bezerros, três meses depois de realizada a colheita, apresentou sinais clínicos de incoordenação motora e de enfraquecimento progressivo, seguido do óbito.

Os sinais clínicos apresentados por esse bezerro poderiam ser resultantes de outra etiologia, mas por outro lado também poderiam estar relacionados à baixa resistência imunológica, características comuns aos animais PI (BOLIN, 1990), o que contribui para que a taxa de letalidade seja alta no primeiro ano de vida (BAKER, 1987). Já o outro bezerro teve o desenvolvimento normal, mas segundo o proprietário, sempre foi mais fraco em relação aos demais animais do mesmo lote.

A utilização de estratégias para a pesquisa de rebanhos infectados pelo BVDV é uma alternativa prática e econômica para o direcionamento do estado sanitário de um rebanho (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004). A pesquisa de anticorpos ou do vírus no leite de conjunto e a utilização de animais sentinelas podem demonstrar a circulação viral ou a ocorrência recente da infecção nos rebanhos. Neste trabalho, a estratégia utilizada foi a pesquisa de anticorpos neutralizantes em animais sentinelas, no caso bezerros com idade entre 6 e 12 meses (PILLARS & GROOMS, 2002), pois dessa maneira qualquer tipo de rebanho pôde ser submetido à amostragem (SEKI et al., 2006).

A metodologia descrita por PILLARS & GROOMS (2002) foi desenvolvida para o diagnóstico em rebanhos leiteiros. Para a análise de bezerros sentinelas em rebanhos de corte seria necessário o estabelecimento de uma estratégia de amostragem (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004). Entretanto, nesta pesquisa foram encontrados animais PI num rebanho de corte utilizando a metodologia desenvolvida para rebanhos leiteiros.

Levando em consideração o sistema de criação da maioria dos rebanhos de corte no Brasil, nos quais todas as categorias de animais são mantidas num mesmo grupo, tal metodologia poderia ser aplicada para os rebanhos de corte. Afinal, se os animais PI estiverem presentes nesses rebanhos, a probabilidade dos demais animais entrarem em contato com eles é muito maior do que nos rebanhos leiteiros, e conseqüentemente o número de animais reagentes seria maior. Tanto é que, nos testes de VN empregados nas amostras de todos os animais do rebanho 4, foram reagentes ao BVDV1 e ao BVDV 2 acima de 94% das amostras.

De todos os rebanhos analisados, 11 apresentaram bovinos reagentes ao BVDV (1, 2, 3, 4, 5, 7, 16, 17, 20, 21 e 22), sendo sete rebanhos para ambos os genótipos (1,

2, 4, 5, 17, 20 e 21), dois rebanhos somente para o BVDV 1 (7 e 16), e dois rebanhos somente para o BVDV 2 (3 e 22) (Tabela 6). No entanto, a presença de bovinos reagentes na faixa etária analisada nesses rebanhos demonstrou que existiu o contato recente desses animais com o vírus (SEKI et al., 2006), ou por meio de animais PI ou de animais TI (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

A pesquisa de animais PI foi realizada apenas nos rebanhos que apresentaram resultados dentro dos parâmetros sugeridos por PILLARS & GROOMS (2002). Entretanto, no caso dos rebanhos 20 e 21, foram detectados bovinos reagentes com altos títulos de anticorpos, porém com número de bovinos insuficiente quando relacionados aos parâmetros utilizados na seleção. O baixo número de reagentes poderia ser devido ao período transitório entre a introdução da infecção no rebanho e o nascimento de animais PI (HOUE, 1994). Outra hipótese seria que os altos títulos de anticorpos encontrados nesses animais seriam resultantes de uma infecção recente e poucos animais do rebanho haviam tido contato com a fonte de infecção (PILLARS & GROOMS, 2002).

Nos outros dois rebanhos (rebanhos 1 e 17), dos quais foram colhidas amostras pareadas de todos os animais, não foram detectados animais PI. Entretanto, no teste de VN para o BVDV 1 e BVDV 2, foram reagentes no rebanho 1 acima de 80% dos bovinos e, no rebanho 17, acima de 70% dos bovinos foram reagentes. Esses resultados justificam a quantidade de animais reagentes detectada na amostragem, bem como os altos títulos de anticorpos, sugerindo que a fonte de infecção do BVDV teria sido eliminada recentemente desses rebanhos (HOUE, 1999).

Entretanto, nos rebanhos 1 e 17, a detecção de animais PI poderia estar comprometida nas amostras de soro sanguíneo dos bovinos com idade inferior a seis meses, pois os anticorpos colostrais neutralizam o vírus livre e podem impedir o diagnóstico desses animais (BEZEK & MECHOR, 1992; DUBOVI, 1996; SALIKI et al, 1997; STOKSTAD & LOKEN, 2002). A confirmação da ausência de animais PI nesses rebanhos somente poderia ser estabelecida por meio de novos testes nesses mesmos bezerros depois dos seis meses de idade, período em que os anticorpos colostrais não seriam mais detectáveis (KELLING, 1990; PILLARS & GROOMS, 2002).

A persistência é a única forma de manutenção do BVDV nos rebanhos bovinos e, conseqüentemente, na natureza. A complexidade da enfermidade apresenta reflexos também no diagnóstico laboratorial, pois é necessário o conhecimento da patogenia da BVD para a interpretação dos resultados obtidos. Nesse contexto estão inseridas as estratégias de amostragem, que mesmo apresentando limitações, são suficientes para direcionar o raciocínio clínico do médico veterinário ou até mesmo para confirmar suspeitas de rebanhos infectados.

3.7 CONCLUSÕES

- Demonstrou-se a ocorrência de animais PI pelo BVDV num rebanho bovino localizado no Estado de Minas Gerais;
- Utilizando a mesma estratégia de amostragem para o diagnóstico de rebanhos com animais PI, esses animais foram detectados apenas em um dos três rebanhos selecionados;
- A estratégia de amostragem adotada para a detecção de animais PI em rebanhos leiteiros foi suficiente para a detecção de animais PI num rebanho de corte.

3.8 REFERÊNCIAS

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

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

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

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

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 51-68, 2004.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIMDILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

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

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

BROCK, K. V.; GROOMS, D. L.; GIVENS, M. D. Reproductive disease and persistent infections. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 8, p. 145-155.

BRODERSEN, B. W. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 85-93, 2004.

BROWNLIE, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 371-382, 1990.

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de

expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 161-168, 2003.

DREW, T. W.; YAPP, F.; PATON, D. J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 145-154, 1999.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 9, p. 867-872, 1996.

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

FULTON, R. W.; HESSMAN, B.; JOHNSON, B. J.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; SJEKLOCHA, D.; CONFER, A. W.; FUNK, R. A.; PAYTON, M. E. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 228, n. 4, p. 578-584, 2006.

GOYAL, S. M. Diagnosis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 12, p. 197-208.

HOUE, H. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy herds. **Research in Veterinary Science**, London, v. 53, n. 3, p. 320-323, 1992.

HOUE, H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 275-283, 1993.

HOUE, H. Bovine virus diarrhea virus: detection of Danish dairy herds with persistently infected animals by means of a screening test of ten young stock. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 19, n. 3-4, p. 241-248, 1994.

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

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

HOUE, H. Risk assessment. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 2, p. 35-63.

HOUE, H.; MEYLING, A. Prevalence of bovine virus diarrhea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 9-16, 1991.

KELLING, C. L.; STINE, L.; RUMP, K.; PARKER, R.; Investigation of bovine viral diarrhea virus infections in a range beef cattle herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 197, n. 5, p. 589-593, 1990.

KENNEDY, J. A. Diagnostic efficacy of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to screen cattle for persistent bovine viral diarrhea virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 229, n. 9, p. 1.472-1.474, 2006.

KOZASA, T.; TAJIMA, M.; YASUTOMI, I.; SANO, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Relationship of bovine viral diarrhea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms base on bulk tank milk test by RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 41-47, 2005.

LARSON, R. L. Management systems and control programs. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 14, p. 223-238.

LARSON, R. L.; MILLER, R. B.; KLEIBOEKER, S. B.; MILLER, M. A.; WHITE, B. J. Economic costs associated with two testing strategies for screening feeder calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 226, n. 2, p. 249-254, 2005.

LIEBLER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 7, p. 121-143.

LONERAGAN, G. H.; THOMSON, D. U.; MONTGOMERY, D. L.; MASON, G. L.; LARSON, R. L. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhea virus in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 226, n. 4, p. 595-601, 2005.

O'CONNOR, A.; REED, M. C.; DENAGAMAGE, T. N.; YOON, K. J.; SORDEN, S. D.; COOPER, V. L. Prevalence of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus in beef cow-calf herds enrolled in a voluntary screening project. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 230, n. 11, p. 1691-1696, 2007.

OIE. Office International des Épizooties. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Paris. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00132.htm>. Acesso em: 30 ago. 2007.

PILLARS, R. B.; GROOMS, D. L. Serologic evaluation of five unvaccinated heifers to detect herds that have cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 499-505, 2002.

PILZ, D.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarreia viral bovina pela RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sangüíneo, artificialmente contaminados. **Semina**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 219-228, 2005.

RADWAN, G. S.; BROCK, K. V.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk tank milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 77-91, 1995.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 12, n. 2, p. 101-106, 1998.

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

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 69-83, 2004.

SALIKI, J. T.; FULTON, R. W.; HULL, S. R.; DUBOVI, E. J. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 4, p. 803-807, 1997.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.

SCHODER, G.; MÖSTI, K.; BENETKA, V.; BAUMGARTNER, W. Different outcome of intrauterine infection with bovine viral diarrhea (BVD) virus in twin calves. **The Veterinary Record**, London, v. 154, n. 2, p. 52-53, 2004.

SEKI, Y.; SEIMIYIA, Y. N.; YAEGASHI, G.; SATO, C. Identification of herds with cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus by virological evaluation of three calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 255-258, 2006.

SMITH, D. V.; GROTELUESCHEN, D. M. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 131-149, 2004.

STOKSTAD, M.; LOKEN, T. *Pestivirus* in cattle: experimentally induced persistent infection in calves. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v. 49, n. 10, p. 494-501, 2002.

THÜR, B.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v.43, n. 3, p.163-166, 1996.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 343-346, 2001.

WALDNER, C. L.; CAMPBELL, J. R. Use of serologic evaluation for antibodies against bovine viral diarrhea virus for detection of persistently infected calves in beef herds. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 66, n. 5, p. 825-834, 2005.

WITTUM, T. E.; GROTELUESCHEN, D. M.; BROCK, K. V.; KVASNICKA, W. G.; FLOYD, J. G.; KELLING, C. L.; ODDE, K. G. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 83-94, 2001.

CAPÍTULO 4 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ESTIRPES DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA DETECTADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS

RESUMO – Estirpes do BVDV detectadas em dois animais persistentemente infectados num rebanho localizado no Estado de Minas Gerais foram submetidas à caracterização filogenética. A alta frequência de mutações sofridas pelo BVDV também foi verificada por meio da comparação das seqüências de nucleotídeos da mesma estirpe do BVDV, detectada num dos animais persistentemente infectados, e provenientes de amostras colhidas com intervalo de 18 meses. O produto da PCR utilizado no seqüenciamento viral foi obtido a partir das amostras de soro sangüíneo dos animais persistentemente infectados. Na análise filogenética, as estirpes foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo BVDV 1, subgenótipo BVDV 1b, e as seqüências de nucleotídeos oriundas da mesma estirpe do vírus foram idênticas no segmento analisado. A diversidade genética do BVDV é uma condição também encontrada no Brasil, e deve ser objeto de estudos para o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle da enfermidade no país, principalmente na utilização de vacinas, uma vez que a maioria delas é produzida apenas com estirpes de referência do BVDV 1a.

Palavras-chave: análise filogenética, BVDV, diversidade genética, genótipos, subgenótipos

4.1 INTRODUÇÃO

Do mesmo modo que os demais RNA-vírus, o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) apresenta ampla heterogeneidade entre as estirpes, que são manifestadas pelas diferenças entre o fenótipo (biótipo e virulência) e o genótipo (RIDPATH, 2005). As estirpes de BVDV são caracterizadas pela grande variabilidade genética, antigênica e patogênica, que se refletem nas manifestações clínicas, nos resultados dos testes de diagnóstico laboratorial e na utilização de vacinas (HAMERS et al., 2001).

A alta frequência de mutação, a tendência para a recombinação genética e a pressão seletiva imposta pela resposta imune do hospedeiro levam à criação da diversidade genética do BVDV. Essas variantes são agrupadas com base na homologia das seqüências de segmentos do genoma viral e formam os genótipos, os subgenótipos dentro dos genótipos, e as estirpes virais no grupo dos subgenótipos (BOLIN & GROOMS, 2004).

A caracterização dos genótipos circulantes nos rebanhos bovinos de uma determinada região pode contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia e da patogenia das infecções pelo BVDV, além de influenciar na escolha das estirpes utilizadas na vacinação. Os dados relacionados à classificação das estirpes de BVDV que ocorrem nos rebanhos brasileiros são bastante escassos, o que leva principalmente ao questionamento da eficácia das vacinas utilizadas no país, por serem produzidas a partir de estirpes isoladas em outros países.

4.2 REVISÃO DE LITERATURA

O genoma do BVDV consiste em uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com 12.300 pares de bases, e possui uma extensa “open reading frame” (ORF), que codifica uma única poliproteína. A ORF inicia-se com o gene de uma autoprotease viral N^{pro}, seguido pelos genes das proteínas estruturais, que consistem nas proteínas do capsídeo e três proteínas do envelope (E^{ns}, E1 e E2), e os genes das proteínas não-estruturais. O genoma contém regiões não traduzidas nas extremidades finais (5'UTR e 3'UTR) (DONIS, 1995).

A diversidade genética que ocorre entre as estirpes isoladas no campo é característica comum entre os BVDV, os quais existem na natureza como *quasispecies* (uma grande quantidade de mutantes virais). Quando comparados aos DNA-vírus, os RNA-vírus são altamente mutáveis e, sobretudo aqueles de polaridade positiva como o BVDV, estão sujeitos a modificações genômicas no ácido nucléico que envolvem pontos de mutação ou recombinações, homólogas ou heterólogas (BOLIN & GROOMS, 2004).

As mutações ocorrem por alteração de um único nucleotídeo ou pela remoção de uma secção do genoma do BVDV. As recombinações podem ocorrer entre o hospedeiro e o vírus, resultando na inserção de seqüências do genoma do hospedeiro no genoma viral, ou pelo rearranjo ou duplicação de uma seqüência de nucleotídeos do genoma viral. Um desses eventos pode desencadear a clivagem da proteína NS23 em NS2 e NS3, que está associada com a citopatogenicidade do BVDV (GOENS, 2002).

A ocorrência de pontos de mutação nos RNA-vírus é tão comum que estima-se a ocorrência de uma mutação a cada 10.000 replicações. Como o BVDV possui no seu genoma aproximadamente 12.300 pares de bases, com tal freqüência de mutação, é provável que ocorra pelo menos uma mudança de nucleotídeo a cada ciclo de replicação viral. Desta maneira, cada progênie é diferente do vírus original em um ou mais pontos, e uma grande quantidade de mutantes será criada a cada ciclo de replicação do vírus (HAMERS et al., 2001; BOLIN & GROOMS, 2004).

Nos animais persistentemente infectados (PI), a multiplicação do BVDV ocorre em altas quantidades por meses ou até mesmo anos. Porém, esta abundante proliferação viral parece não gerar uma diversidade genética do vírus, possivelmente porque essas variantes seriam eliminadas pelo sistema imunológico dos animais PI (HAMERS et al., 2001; GOENS, 2002). Algumas pesquisas demonstraram que os animais PI estabilizam as estirpes de BVDV, tornando-as específicas para cada rebanho (HAMERS et al., 1998). O surgimento de mutantes de BVDV ocorre nas infecções agudas em animais não PI, pois nesses animais o vírus consegue evadir-se da resposta imune (HAMERS et al., 2001).

Os grupos genéticos do BVDV de diferentes partes do mundo são definidos a partir de várias regiões do genoma (TAJIMA et al., 2001). A caracterização genotípica é realizada com base na diversidade genética encontrada na região 5'UTR ou nas proteínas não estruturais N^{pro} e E2 (VILCEK et al., 2001). As variações nas seqüências da região 5' UTR são conservadas entre as diferentes espécies do *Pestivirus* e são utilizadas na reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) para a segregação dos isolamentos de BVDV em genótipos e subgenótipos (RIDPATH & BOLIN, 1998).

As análises da região 5'UTR são empregadas principalmente na caracterização de estirpes de BVDV isoladas no campo, pelo fato de ser uma região altamente conservada (RIDPATH et al., 1994; RIDPATH & BOLIN, 1998). Além disso, a realização da análise da 5'UTR é mais vantajosa, pois está disponível no "GenBank" um número bem maior de seqüências desta região para comparação do que de outra região do genoma viral (VILCEK, 2005).

As estirpes de BVDV foram segregadas nos genótipos BVDV 1 e BVDV 2, com base na comparação das seqüências da região 5'UTR do genoma viral (PELLERIN et al., 1994). O BVDV foi ainda subdividido em subgenótipos, e a primeira subdivisão surgiu na América do Norte, com a classificação em BVDV 1a e BVDV 1b (PELLERIN et al., 1994; KELLING, 2004).

Tanto o biótipo não citopatogênico (NCP) quanto o biótipo citopatogênico (CP) do BVDV 1 e do BVDV 2 ocorrem na natureza, e ambos podem induzir a infecção

persistente e a doença das mucosas (MD) (BOLIN & RIDPATH, 1996). Entretanto, enquanto o tipo antigênico parece estar ligado ao genótipo, o mesmo não ocorre com a virulência, porque cada genótipo contém estirpes virulentas. O BVDV 2 está relacionado à forma severa da doença, mas muitos BVDV 2 induzem enfermidades de pouca gravidade ou subclínicas, assim como o BVDV 1 pode manifestar-se na forma severa (KELLING, 2004).

O subgenótipo BVDV 1a, cuja estirpe de referência é a NADL, caracteriza os isolamentos clássicos do BVDV originários da América do Norte e são empregados na produção de vacinas utilizadas por vários países. O subgenótipo BVDV 1b caracteriza os isolamentos clássicos do BVDV realizados na Europa e tem como referência a estirpe Osloss (van RIJN et al., 1997). No entanto, VILCEK et al. (2001) propuseram uma subdivisão do BVDV 1 em onze subgenótipos, e comparações de estirpes isoladas no Estado do Rio Grande do Sul mostraram que o BVDV 2 pode também ser subdividido em dois subgenótipos: BVDV 2a e BVDV 2b (FLORES et al., 2002).

Os genótipos virais apresentam 60% de similaridade na seqüência das bases, os subgenótipos apresentam entre 80% e 85% de similaridade, e cada subgenótipo representa um grupo de estirpes que apresentam mais de 90% de similaridade (BOLIN & GROOMS, 2004). Os genótipos do BVDV devem ser distintos e estáveis, isto é, deve haver uma clara definição entre os grupos virais, e as estirpes isoladas não devem diferir desses grupos. A ocorrência do BVDV 1 e do BVDV 2 deve estar associada às observações práticas no campo, à distribuição geográfica, à variabilidade antigênica ou às variações na virulência (RIDPATH, 2003).

Os primeiros relatos sobre a ocorrência dos genótipos e subgenótipos foram realizadas nos Estados Unidos e no Canadá (RIDPATH, 2005). Publicações mais recentes também citam a ocorrência do BVDV 1, do BVDV 2 e seus subgenótipos em outros países, tais como a ocorrência de BVDV 1a e 2 na Argentina (JONES et al., 2001; ODEÓN et al., 2003; VILCEK et al., 2004); BVDV 1c no Japão (TAJIMA, 2004); BVDV 1b na Índia (MISHRA et al., 2004); BVDV 1j no Egito (VILCEK et al., 2004); BVDV 1a e 1c na Austrália (MAHONY et al., 2005); BVDV 1 e 2 na Tunísia (THABIT et al., 2005); BVDV 1a, 1b e 2a nos Estados Unidos (TAJIMA & DUBOVI, 2005); BVDV 1a,

1b, 1c e 2 no Chile (PIZARRO-LUCERO et al., 2006); BVDV 1a, 1b, 1c, 1j e 2a no Japão (MATSUNO et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2008).

Na Europa, existe um grande número de relatos, como a ocorrência do BVDV 1a, 1b e 1i no Reino Unido (VILCEK et al., 1999); BVDV 1a, 1b, 1d, 1f, 1g e 2 na Alemanha (TAJIMA et al., 2001); BVDV 1a, 1b e 2 na Bélgica (COUVREUR et al., 2002); BVDV 1e e 2 na Eslováquia (VILCEK et al., 2002; VILCEK et al., 2004); BVDV 1b, 1d, 1f, 1g, 1h e 2 na Áustria (VILCEK et al., 2003); BVDV 1e na Espanha (HURTADO et al., 2003); BVDV 1b, 1c e 1d, 1e, 1f, 1h e 2 na Itália (LUZZAGO et al., 2001; FALCONE et al., 2003); BVDV 1b, 1d, 1f e 1g na Eslovênia (TOPLAK et al., 2004); BVDV 1d, 1f e 1j na Finlândia (VILCEK et al., 2004); BVDV 1b, 1e, 1h e 1k na Suíça (STALDER et al., 2005); BVDV 1a, 1b e 1d na Suécia (STAHL et al., 2005); BVDV 1a, 1b, 1d, 1e, e 2 em Portugal (BARROS et al., 2006).

Nos Estados Unidos, o BVDV 1b é o subgenótipo de maior ocorrência dentre as estirpes isoladas de BVDV (FULTON et al., 2003). Tanto é que na análise realizada por FULTON et al. (2005) em 131 estirpes, 60 eram pertencentes ao subgenótipo 1b, 37 ao subgenótipo 1a e 34 ao subgenótipo 2a.

Também nos Estados Unidos, das 53 estirpes do BVDV isoladas em rebanhos leiteiros, 26 pertenciam ao BVDV 1b, seis ao BVDV 1a e 21 ao BVDV 2a (TAJIMA & DUBOVI, 2005). No mesmo país, de 86 estirpes do BVDV isoladas em rebanhos de corte, 67 pertenciam ao BVDV 1b, 10 ao BVDV 1a e 9 ao BVDV 2a. Nessa pesquisa, verificou-se também que o BVDV 1b foi o subgenótipo mais comumente isolado de bezerros PI (FULTON et al., 2006).

No Brasil, FLORES et al. (2000) realizaram o seqüenciamento e a análise filogenética de 17 amostras do BVDV isoladas no país, identificando quatro amostras pertencentes ao BVDV 1a, nove amostras ao BVDV 1b e quatro amostras ao BVDV 2. As amostras brasileiras do BVDV 2 apresentaram-se genotipicamente distintas das amostras até então identificadas na América do Norte e na Europa, o que levou posteriormente à segregação do BVDV 2 nos subgenótipos BVDV 2a e BVDV 2b (FLORES et al., 2002).

A diversidade genética do BVDV foi pesquisada por VILCEK et al. (2004) em alguns países, inclusive no Brasil. Nas análises filogenéticas realizadas em 10 amostras brasileiras, foram identificadas quatro pertencentes ao BVDV 1a, duas ao BVDV 1b, uma ao BVDV 1d e três ao BVDV 2. Nessa pesquisa, foi também identificado um novo grupo filogenético relacionado às estirpes européias, o BVDV 1k.

A partir de estirpes isoladas no Brasil, CORTEZ et al. (2005) verificaram que, das 19 amostras isoladas de BVDV, 11 pertenciam ao BVDV 1, seis ao BVDV 2, e duas foram agrupadas num terceiro grupo de amostras denominado como sendo atípico. Nas amostras de BVDV 1, oito eram pertencentes ao BVDV 1a e três ao BVDV1b, e nas amostras de BVDV 2, duas pertenciam ao BVDV 2a e quatro ao BVDV 2b.

Existem evidências de que o BVDV 1a, o BVDV 1b e o BVDV 2 podem induzir diferentes manifestações clínicas. Desta forma, torna-se necessária a caracterização genotípica da estirpe do BVDV isolado, pois futuramente essa caracterização poderá direcionar os estudos epidemiológicos na ocorrência de um surto de diarreia viral bovina (BVD) (SALIKI & DUBOVI, 2004).

No estudo retrospectivo de diagnósticos para BVDV realizado por EVERMAN & RIDPATH (2002), o BVDV 1 estava mais relacionado às infecções persistentes, à ocorrência de defeitos congênitos e ao nascimento de bezerros fracos, enquanto o BVDV 2 foi encontrado principalmente nos casos de abortos. O BVDV 1a predomina em infecções fetais acima de 100 dias de gestação (RIDPATH, 2005), e o BVDV 1b predomina nas enfermidades respiratórias (FULTON et al., 2005; RIDPATH, 2005; GALAV et al., 2007).

As análises filogenéticas de estirpes de BVDV 1 isoladas na Europa por VILCEK et al. (2005) mostraram que predominam diferentes subgenótipos conforme a origem das estirpes. Segundo os autores, os dados das análises filogenéticas contribuirão para o melhor entendimento da evolução e da classificação do *Pestivirus*, além da maior compreensão da epidemiologia molecular nas infecções causadas pelo BVDV.

No Japão, a análise filogenética das estirpes do BVDV detectadas em bovinos importados da Austrália, China, Canadá e Estados Unidos, entre os anos de 1991 e

2005, revelou que as estirpes eram geneticamente heterogêneas, mas geograficamente restritas (YAMAMOTO et al., 2008).

O conhecimento dessa diversidade é importante para o monitoramento do surgimento de novas variantes em países, regiões (TAJIMA et al., 2001; MAHONY et al., 2005) ou até mesmo em rebanhos, pois favorece o desenvolvimento de testes diagnósticos mais eficazes e de vacinas que conferem maior proteção contra as diferentes variantes (HAMERS et al., 2001).

A caracterização genotípica do BVDV é importante para o diagnóstico clínico e para o desenvolvimento de vacinas que contenham o subgenótipo predominante na região, pois a diversidade genética influencia o controle quando são utilizadas vacinas contendo subgenótipos diferentes daqueles circulantes nos rebanhos bovinos (FULTON et al., 2005). Alguns estudos demonstraram que vacinas contendo apenas o BVDV 1a induziram baixos títulos de anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1b (FULTON et al., 2003).

A existência de subgenótipos é um reflexo da diversidade do BVDV que existe na natureza (FULTON et al., 2005). Essa diversidade encontrada pelo mundo continua em expansão, pois novas populações estão sendo pesquisadas e um número cada vez maior de seqüências genômicas está sendo caracterizado (BARROS et al., 2006).

4.3 OBJETIVOS

- Realizar a análise filogenética de amostras do BVDV detectadas em bovinos PI no Estado de Minas Gerais;
- Comparar as seqüências de nucleotídeos de uma mesma estirpe do BVDV, detectada num animal PI, provenientes de amostras colhidas em períodos distintos.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Amostras

Três amostras de BVDV detectadas em soro sangüíneo de animais PI pela RT-PCR foram submetidas ao seqüenciamento parcial da região não-traduzida 5'UTR para a caracterização genotípica e subgenotípica. No primeiro momento, foram detectadas duas estirpes provenientes de dois animais PI, e posteriormente, em um desses animais, foi realizada uma segunda detecção após 18 meses.

Os animais eram oriundos de um mesmo rebanho bovino localizado no município de Poço Fundo, região Sul do Estado de Minas Gerais.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa - RT-PCR

O produto da PCR utilizado no seqüenciamento viral foi obtido conforme a metodologia descrita no item 3.4.5 do Capítulo 3.

4.4.3 Seqüenciamento viral

A purificação, a quantificação e o seqüenciamento dos produtos de PCR foram realizados no Setor de Seqüenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo - São Paulo/SP. A purificação foi realizada utilizando o “kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification” Amersham[®], e a quantificação realizada em gel de agarose a 2%, utilizando “Low DNA Ladder” Invitrogen[®], conforme orientações dos fabricantes.

A seqüência de nucleotídeos dos produtos amplificados foi determinada utilizando o sistema de análise de DNA “MEGABACE 1000 DYEnamic ET Dye Terminator kit” GE Healthcare[®]. Cada produto de PCR foi seqüenciado utilizando os “primers” 103 “sense” e 372 “anti-sense” (WEINSTOCK et al., 2001) para a realização da seqüência-consenso.

4.4.4 Análise filogenética

O índice de qualidade dos cromatogramas foi verificado no “software” PHRED (PHRED, 2007). Após essa verificação, os cromatogramas foram analisados no “software” BIOEDIT (HALL, 1999), para a determinação da seqüência-consenso, e a identidade foi confirmada no “software” BLAST (BLAST, 2007).

O alinhamento das seqüências foi determinado pelo “software” CLUSTAL W., incluso no “software” BIOEDIT, e os valores de similaridade entre as seqüências foram obtidos no “software” MATGAT (MATGAT, 2007). A determinação do modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos no grupo das seqüências analisadas foi verificada no “software” MODEL TEST (POSADAS & CRANDALL, 1988).

A reconstrução filogenética foi realizada no “software” MEGA versão 4.0 (KUMAR et al., 2000), utilizando como algoritmo o método de “Neighbor-joining” (parâmetro Kimura 2) e os valores de “Bootstraps” foram calculados utilizando 1.000 pseudo-replicatas. Nessa reconstrução, foram utilizadas para comparação seqüências obtidas no “GenBank” (GENBANK, 2007) de estirpes de referência do BVDV 1 e do BVDV 2, de estirpes de cada subgenótipo e de estirpes de BVDV isoladas no Brasil, além de estirpes do vírus da “border disease” (BDV) e do vírus da peste suína clássica (CSFV) (Tabela 11).

Tabela 11. Estirpes de referência do BVDV, com o respectivo subgenótipo, estirpes de referência do CSFV e do BDV, bem como origem e número de acesso no “GenBank”, utilizadas para comparação na análise filogenética das amostras de BVDV detectadas no Estado de Minas Gerais

BVDV	Estirpe	Origem	Acesso “GenBank”
1a	NADL	EUA	M31182
1a	Singer	EUA	DQ088995
1a	BR275	Brasil	U94915
1a	R1935/72	Brasil	U94916
1a	Nose	Japão	AB019670
1a	Oregon C24V	Inglaterra	AF091605
1a	BR-UFMG-4	Brasil	AF258613
1b	Osloss	Alemanha	M96687
1b	NY-1	EUA	L32879
1b	3P	Argentina	AF244968
1b	UEL1-BR/04	Brasil	EF406123
1b	1248/01	Espanha	AY159545
1c	M079B-91	Moçambique	U97410
1d	2900/83	Alemanha	AJ304375
1e	3186V6	Itália	AF298062
1f	4998/89	Alemanha	AJ304385
1g	A	Eslováquia	AF298064
1h	G	Eslováquia	AF298066
1i	23-15	Inglaterra	AF298059
2a	890	EUA	U18059
2b	Soldan	Brasil	U94914
2b	LV-86	Brasil	AF410787
2b	VS-123	Brasil	AF410790
BDV	BDV Rudolph	Japão	AB122086
CSFV	CSFV/MP	Índia	AY182247

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Seqüenciamento viral

As seqüências de nucleotídeos das amostras do BVDV detectadas nos dois animais PI apresentaram diferenças em alguns nucleotídeos. Sendo assim, as estirpes foram consideradas distintas e foram denominadas como BR-UNESP-JAB 1 e BR-UNESP-JAB 2.

No entanto, a segunda amostra de BVDV detectada em um dos animais PI mostrou a mesma seqüência de nucleotídeos da primeira seqüência obtida (BR-UNESP-JAB 2).

4.5.2 Análise filogenética

Na análise filogenética, as estirpes analisadas foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo BVDV 1, subgenótipo BVDV 1b (Figura 2).

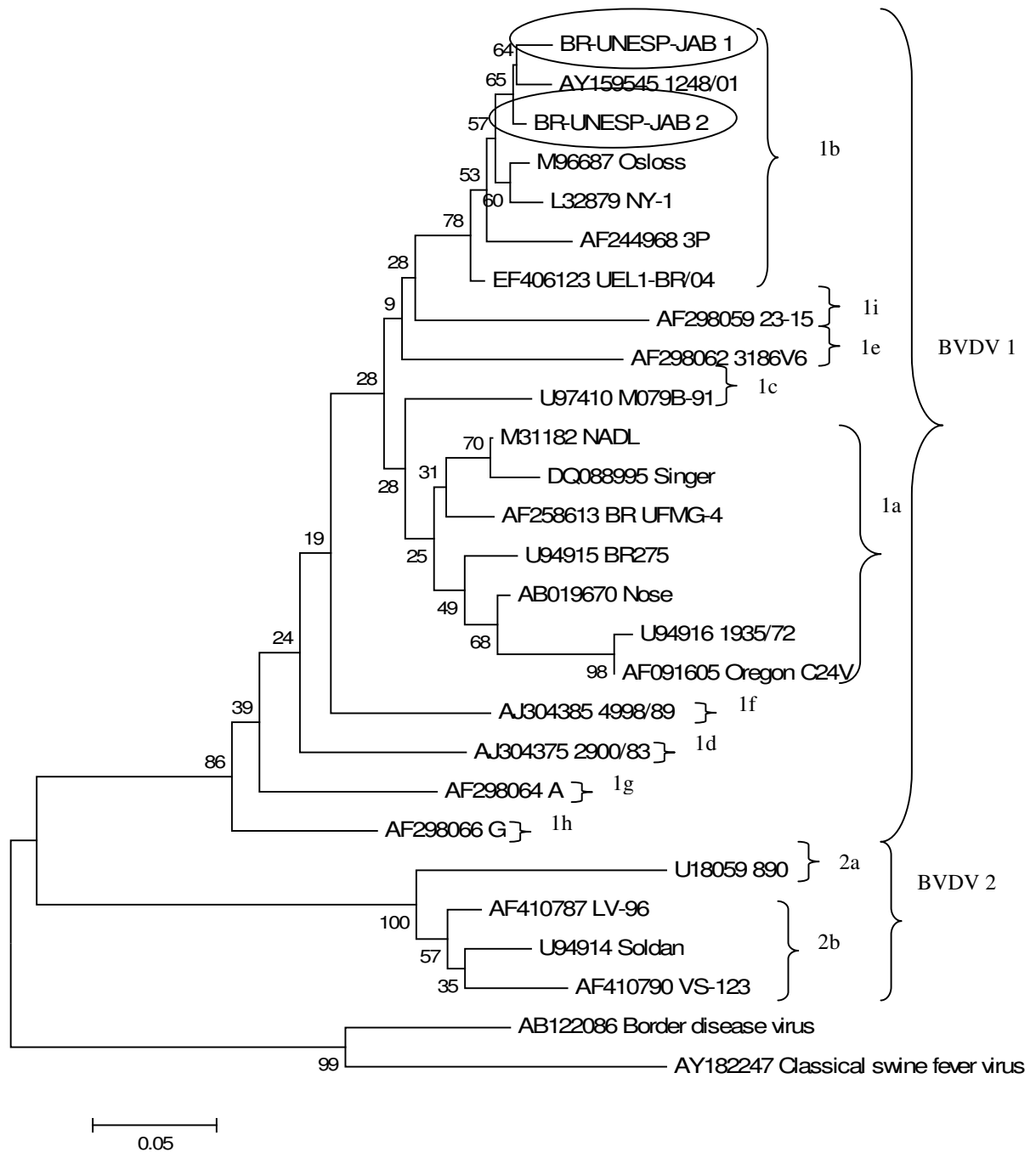


Figura 2. Árvore filogenética, com base em 248 pares de bases da região 5'UTR, de 23 estirpes de BVDV, uma estirpe do BDV e uma estirpe do CSFV. As seqüências BR-UNESP-JAB 1 e BR-UNESP-JAB 2 foram comparadas com seqüências obtidas no "GenBank"

4.6 DISCUSSÃO

Na análise filogenética, as estirpes do BVDV detectadas em dois animais PI no Estado de Minas Gerais eram pertencentes ao subgenótipo BVDV 1b, portanto apresentaram mais de 90% de similaridade genética quando comparadas com estirpes deste mesmo subgenótipo (BOLIN & GROOMS, 2004). Essas estirpes virais estão inseridas no mesmo grupo das estirpes clássicas do BVDV 1 isoladas na Europa, tendo como referência a estirpe Osloss (van RIJN et al., 1997).

Nos Estados Unidos, o BVDV 1b foi o subgenótipo mais freqüente entre as estirpes isoladas do BVDV (FULTON et al., 2003; FULTON et al., 2005; TAJIMA & DUBOVI, 2005; FULTON et al., 2006), além de ter sido o subgenótipo mais comumente detectado em bezerros PI (FULTON et al., 2006). Na análise filogenética realizada por FLORES et al. (2000) em estirpes do BVDV isoladas no Brasil, o BVDV 1b também foi o subgenótipo de maior ocorrência.

O BVDV 1b apresenta uma característica peculiar: a sua ocorrência em bovinos com enfermidades respiratórias (FULTON et al., 2005; RIDPATH, 2005; GALAV et al., 2007). O envolvimento do vírus não restringe somente na sua atuação como agente imunossupressor, o qual favorece a instalação de outros patógenos, mas também por atuar como um agente infeccioso primário, desempenhando um importante papel no complexo respiratório bovino (FULTON et al., 2006).

Segundo YAMAMOTO et al. (2008), as estirpes do BVDV são geograficamente restritas, existindo inclusive a predominância de um determinado subgenotipo numa região. Como as estirpes do BVDV 1b foram detectadas num rebanho localizado na região Sul do Estado de Minas Gerais, sugere-se que estirpes desse subgenótipo poderiam estar presentes em outros rebanhos infectados da mesma região.

A pecuária leiteira é característica da região Sul do Estado de Minas Gerais, e os rebanhos nela presentes são constituídos de animais criados de forma mais intensiva, o que contribui para a maior ocorrência das afecções respiratórias não somente em bezerros, mas também nos animais adultos. Sendo assim, as infecções pelo BVDV nos

rebanhos bovinos dessa região não devem apenas estar relacionadas às alterações na esfera reprodutiva, mas também às enfermidades respiratórias.

Neste estudo, também foram analisadas duas seqüências de nucleotídeos de uma mesma estirpe do BVDV, provenientes de amostras de um animal PI e que foram colhidas num intervalo de 18 meses. Na comparação das seqüências, não foi verificada nenhuma alteração de nucleotídeos, pelo menos no segmento analisado. Para HAMERS et al. (2001), a abundante replicação viral nos animais PI parece não gerar diversidade genética, possivelmente pelo fato da eliminação das variantes pelo sistema imunológico desses animais.

A existência do BVDV na natureza como *quasispecies* (BOLIN & GROOMS, 2004) é resultante da alta freqüência de mutações ou recombinações genéticas sofridas pelo vírus, com o objetivo de evadir-se da resposta imune do hospedeiro para persistir nos rebanhos e na natureza. A variabilidade genética do BVDV interfere nos testes de diagnóstico laboratorial (HAMERS et al., 2001), pois reflete na diversidade antigênica e compromete os resultados obtidos nos testes sorológicos.

A variabilidade genética do BVDV também possui implicações na utilização de vacinas, uma vez que a maioria delas é produzida apenas com estirpes de referência do BVDV 1a (van RIJN et al., 1997). No entanto, são 11 os subgenótipos do BVDV 1 (VILCEK et al., 2001) e dois do BVDV 2 (FLORES et al., 2002), e segundo FULTON et al. (2003), vacinas contendo apenas o BVDV 1a induziram baixos títulos de anticorpos neutralizantes contra estirpes do BVDV 1b.

O BVDV apresenta ampla heterogeneidade entre as estirpes (RIDPATH, 2005) e a detecção do subgenótipo BVDV 1b nesta pesquisa complementa a heterogeneidade apresentada pelos isolamentos do BVDV realizados no Brasil, com a detecção do BVDV 1a, 1b e 2 (FLORES et al., 2000); BVDV 2a e 2b (FLORES et al., 2002); BVDV 1a, 1b, 1d e 2 (VILCEK et al., 2004); BVDV 1a, 1b, 2a e 2b (CORTEZ et al., 2005).

No Brasil, estão disponíveis vacinas inativadas contra o BVDV que contêm o BVDV 1a e algumas delas também contêm o BVDV 2. Porém, essas vacinas são produzidas a partir de estirpes isoladas em outros países, o que leva ao questionamento da sua eficácia quando utilizadas nos rebanhos do país (FLORES et

al., 2000). A diversidade genética do BVDV é apenas um dos problemas relacionados à utilização da vacina contra BVD no Brasil, pois também estão incluídos o desconhecimento da complexa patogenia da enfermidade e da duração da resposta imune induzida pela vacina inativada nos animais.

A caracterização genotípica das estirpes do BVDV direcionaria os estudos epidemiológicos (SALIKI & DUBOVI, 2004), e as vacinas poderiam ser desenvolvidas com o subgenótipo predominante na região (FULTON et al., 2005). Essa situação seria a ideal, porém existem entraves para o alcance dessa condição, como a realização do diagnóstico de rebanhos verdadeiramente infectados, a predominância das infecções subclínicas, a dificuldade na detecção dos animais transitoriamente infectados (TI) e a baixa prevalência, o custo e o intensivo trabalho na identificação dos animais PI nos rebanhos.

4.7 CONCLUSÕES

- As estirpes do BVDV detectadas no Estado de Minas Gerais foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo BVDV 1 e ao subgenótipo BVDV 1b;
- As seqüências de nucleotídeos da mesma estirpe do BVDV detectada num animal PI, provenientes de amostras colhidas em períodos distintos, foram idênticas no segmento analisado;
- A diversidade genética do BVDV é uma condição também encontrada no Brasil, e deve ser objeto de estudos para o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle da enfermidade no país.

4.8 REFERÊNCIAS

BARROS, S. C.; RAMOS, F.; PAUPÉRIO, S.; THOMPSON, G.; FEVEREIRO, M. Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 192-195, 2006.

BLAST. **Basic local alignment and search tool**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 14 jul. 2007.

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 51-68, 2004.

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

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; CASTRO, A. M. M. G.; SOARES, R. M.; PINTO, A. M. V.; ALFIERI, A. A.; FLORES, E. F.; LEITE, R. C.; RICHTZENHAIN, L. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2005.

COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; COLLARD, A.; QUENON, P.; DEHAN, P.; HAMERS, C.; PASTORET, P. P.; KERKHOFS, P. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. **Virus Research**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 17-28, 2002.

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

EVERMANN, J. F.; RIDPATH, J. F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 129-139, 2002.

FALCONE, E.; CORDIOLI, P.; TARANTINO, M.; MUSCILLO, M.; LA ROSA, G.; TOLLIS, M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 485-495, 2003.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F., GIL, L. H. V. G. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 51-60, 2002.

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

FULTON, R. W.; HESSMAN, B.; JOHNSON, B. J.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; SJEKLOCHA, D.; CONFER, A. W.; FUNK, R. A.; PAYTON, M. E. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 228, n. 4, p. 578-584, 2006.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 89-95, 2003.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; ORE, S.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV 1a, 1b, and 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1-2, p. 35-40, 2005.

GALAV, V.; MISHRA, N.; BUBEY, R.; RAJUKUMAR, K.; PITALE, S. S.; SHRIVASTAV, A. B.; PRADHAN, H. K. Pathogenicity of an Indian isolate of bovine viral diarrhea virus 1b in experimentally infected calves. **Research in Veterinary Science**, London, v. 83, n. 3, p. 364-368, 2007.

GENBANK. **GenBank Overview**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>>. Acesso em: 14 jul. 2007.

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

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMERS, C.; DEHAN, P.; COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; KERKHOF, P.; PASTORET, P. P. Diversity among bovine pestiviruses. **The Veterinary Journal**, London, v. 161, n. 2, p. 112-122, 2001.

HAMERS, C.; LECOMTE, C.; KCLCSAR, G.; LAMBOT, M.; PASTORET, P. P. Persistently infected cattle stabilize bovine viral diarrhea virus leading to herd specific strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 177-182, 1998.

HURTADO, A.; GARCIA-PEREZ, A. L.; ADURIZ, G.; JUSTE, R. A. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. **Virus Research**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 67-73, 2003.

JONES, L. R.; ZANDOMENI, R.; WEBER, E. L. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 4, p. 367-375, 2001.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 115-129, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, L. B.; NEI, M. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

LUZZAGO, C.; BANDI, C.; BRONZO, V.; RUFFO, G.; ZECCONI, A. Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 265-274, 2001.

MAHONY, T. J.; MCCARTHY, F. M.; GRAVEL, J. L.; CORNEY, B.; YOUNG, P. L.; VILCEK, S. Genetic analysis of bovine viral diarrhea viruses from Australia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1-2, p. 1-6, 2005.

MATGAT. **Matrix global alignment tool**. Disponível em: <<http://bitincka.com/ledion/matgat/>>. Acesso em: 14 jul. 2007.

MATSUNO, K.; SAKODA, Y.; KAMEYAMA, K.; TAMAI, K.; ITO, A.; KIDA, H. Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhea viruses recently isolated from cattle in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 69, n. 5, p. 515-520, 2007.

MISHRA, N.; PATTNAIK, B.; VILCEK, S.; PATIL, S. S.; JAIN, P.; SWAMY, N.; BHATIA, S.; PRADHAN, H. K. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from India. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 3-4, p. 207-212, 2004.

ODEÓN, A. C.; RISATTI, G.; KAISER, G. G.; LEUNDA, M. R.; ODRIÓZOLA, E.; CAMPERO, C. M.; DONIS, R. O. Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 133-144, 2003.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, New York, v. 203, n. 2, p. 260-267, 1994.

PHRED. **Base-calling software with quality information**. Disponível em: <<http://www.bioinformatica.ucb.br/electro.html>>. Acesso em: 14 jul. 2007.

PIZZARO-LUCERO, J.; CELEDÓN, M. O.; AGUILERA, M.; CALISTO, A. Molecular characterization of pestivirus isolated from bovines in Chile. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1-3, p. 208-217, 2006.

POSADAS, J.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 127-131, 2003.

RIDPATH, J. F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 17-30, 2005.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 12, n. 2, p. 101-106, 1998.

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

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 69-83, 2004.

STAHL, K.; KAMPA, J.; BAULE, C.; ISAKSSON, M.; MORENO-LOPÉZ, J.; BELAK, S.; ALENIUS, S.; LINDBERG, A. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 103-108, 2005.

STALDER, H. P.; MEIER, P. H.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RÜFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H. R.; PETERHANS, E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 37-41, 2005.

TAJIMA, M. Bovine viral diarrhea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 131-138, 2004.

TAJIMA, M.; DUBOVI, E. J. Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhea virus isolates from dairy operations in the United States of America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 17, n. 10-15, 2005.

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

THABTI, F.; KASSIMI, L. B.; M'-ZAH, A.; BEN-ROMDANE, S.; RUSSO, P.; BEN-SAID, M. S.; HAMMAMI, S.; PEPIN, M. First detection and genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) types 1 and 2 in Tunisia. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 156, n. 8-9, p. 419-422, 2005. Disponível em: <http://revmedvet.envt.fr/RevMedVet/2005/RMV156_419_422.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2005.

TOPLAK, I.; SANDVICK, T.; BARLIC-MAGANJA, D.; GROM, J.; PATON, D. J. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3-4, p. 175-185, 2004.

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

VILCEK, S.; DREW, T. W.; MCGOLDRICK, A.; PATON, D. J. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 4, p. 227-237, 1999.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; BOBAKOVA, M.; SHARP, G.; PATON, D. J. Identification of bovine viral diarrhoea virus 2 in cattle in Slovakia. **The Veterinary Record**, London, v. 151, n. 5, p. 150-152, 2002.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; PATON, D. J. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 31-35, 2005.

VILCEK, S.; GREISER-WILKE, I.; DURKOVIC, B.; OBRITZHAUSER, W.; DEUTZ, A.; KÖFER, J. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 285-291, 2003.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBARA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEJA, S.; SCICLUNA, M. T.; PAIF, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 1, p. 90-115, 2001.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESÁROVÁ, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 35, n. 5, p. 609-615, 2004.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 343-346, 2001.

YAMAMOTO, T.; KOZASA, T.; AOKI, H.; SEKIGUCHI, H.; MORINO, S.; NAKAMURA, S. Genomic analyses of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3-4, p. 386-391, 2008.

CAPÍTULO 5 - COMPARAÇÃO DOS TESTES DE VIRUSNEUTRALIZAÇÃO CONTRA OS GENÓTIPOS 1 E 2 DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV 1 E BVDV 2) EM REBANHOS BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS

RESUMO – Foram comparados os resultados dos testes de virusneutralização contra o BVDV 1 e o BVDV 2, bem como os respectivos títulos de anticorpos, obtidos em 1925 amostras de soro sangüíneo de rebanhos bovinos naturalmente infectados. A proporção de amostras reagentes entre os genótipos foi analisada pelo Teste de McNemar e pelo Coeficiente κ de concordância, e os títulos de anticorpos das amostras reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 foram comparados pelo Teste de Wilcoxon. Não foi verificada discordância na proporção de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 ($p>0,05$), sendo também muito boa ($\kappa=0,8614$) a correlação existente entre os bovinos reagentes aos genótipos. No entanto, houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos detectados nos testes de virusneutralização contra os genótipos 1 e 2 do BVDV ($p<0,0001$). Apesar das análises estatísticas demonstrarem que a proporção de animais reagentes tenha sido a mesma, resultados falso-negativos seriam obtidos se 67 amostras (3,49%) tivessem sido submetidas apenas ao teste de virusneutralização para o BVDV 1 e em 51 amostras (2,65%) apenas para o BVDV 2. Tais resultados seriam de importância epidemiológica, pois demonstraram a exposição dos animais ao BVDV.

Palavras-chave: anticorpos neutralizantes, BVDV 1, BVDV 2, diversidade antigênica, virusneutralização

5.1 INTRODUÇÃO

A diversidade genética do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) também traduz em variabilidade antigênica. No caso dos genótipos 1 e 2 do BVDV, a diversidade existente entre eles é benéfica para a sobrevivência viral, pois favorece a evasão da resposta imune do hospedeiro (RIDPATH, 2003). Entretanto, ela interfere na realização dos testes diagnósticos e no controle da enfermidade pela vacinação (EDWARDS & PATON, 1995; FULTON et al., 2003).

Grande parte dos laboratórios que realizam os testes de virusneutralização (VN) para o BVDV no Brasil utiliza apenas estirpes do BVDV 1. Por isso são restritas as informações relacionadas à ocorrência do BVDV 2 e da imunidade cruzada existente entre os genótipos nos rebanhos do país. Muitos diagnósticos falso-negativos estão sendo obtidos devido a não utilização do BVDV 2 nos testes de VN.

Também são restritos os estudos que correlacionam bovinos reagentes aos genótipos do BVDV, bem como os respectivos títulos de anticorpos neutralizantes, após uma infecção natural. A maioria dos estudos desenvolvidos estabeleceu apenas a correlação existente entre títulos de anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1 e o BVDV 2 em bovinos vacinados ou experimentalmente infectados.

5.2 REVISÃO DE LITERATURA

Devido ao curto período de viremia que ocorre nas infecções agudas pelo BVDV, a detecção de anticorpos neutralizantes é de grande importância para o diagnóstico da enfermidade. Esses anticorpos são detectados no soro sanguíneo após três semanas do início da infecção (CHASE et al., 2003) e permanecem detectáveis pelo menos por três anos (FREDRIKSEN et al., 1999).

Os anticorpos contra o BVDV podem ser classificados em dois grupos funcionais. Um grupo é constituído pelos anticorpos neutralizantes produzidos contra quatro polipeptídeos estruturais do vírus: a proteína do capsídeo (C), a glicoproteína E^{ms}, a glicoproteína E1 e a glicoproteína E2 (BROCK, 1995; CHASE et al., 2004). O outro grupo é constituído por anticorpos contra a proteína não-estrutural NS2-3, que apesar de ser altamente imunogênica, não induz a produção de anticorpos neutralizantes (SANDVIK, 1999).

Na prática, a imunidade contra o BVDV pode ser detectada pela presença de anticorpos específicos no soro sanguíneo ou no leite (SANDVIK, 2005). Quando apenas uma amostra de soro sanguíneo do rebanho é analisada, a interpretação do resultado torna-se difícil, pois os anticorpos podem ser resultantes de uma infecção anterior (KAPIL et al., 2005).

Sendo assim, é importante a avaliação da imunidade de vários animais do rebanho (KAPIL et al., 2005), e a pesquisa de anticorpos neutralizantes deve ser realizada em amostras pareadas de soro sanguíneo, pois uma única amostra por animal tem o seu diagnóstico limitado nas infecções pelo BVDV, indicando somente a exposição prévia ao agente (FLORES, 2003).

Em rebanhos com suspeita da infecção pelo BVDV, é um equívoco colher amostras dos animais com alterações reprodutivas para o diagnóstico da enfermidade. Neste caso, é recomendável a pesquisa de anticorpos neutralizantes nos animais jovens não vacinados com mais de seis meses de idade (DUBOVI, 1996), já que os anticorpos de origem materna diminuem com o tempo, não sendo mais detectados entre 105 e 230 dias de idade (BAKER, 1987).

Os títulos de anticorpos presentes em gestantes de fetos persistentemente infectados (PI) são bem maiores quando comparados aos títulos encontrados em gestantes de fetos não PI. A característica hiperimune desses animais é consequência do estímulo constante promovido pelo BVDV persistente no feto, e esses altos títulos de anticorpos podem ser utilizados no diagnóstico sugestivo de fetos PI durante o último trimestre de gestação (LINDBERG et al., 2001).

O diagnóstico sorológico do BVDV é comumente realizado apenas pelos testes de VN ou de ELISA (SALIKI & DUBOVI, 2004). A VN é o teste sorológico mais utilizado para detectar anticorpos em amostras de soro sanguíneo (BROCK, 1995), e o teste de ELISA, apesar de apresentar alta especificidade e sensibilidade, não permite a correlação com os títulos de anticorpos nos resultados obtidos (CHASE et al., 2003).

O teste de ELISA também pode ser empregado na pesquisa de anticorpos contra o BVDV em amostras de leite. A disponibilidade dessas amostras e a facilidade para a colheita representam vantagens no diagnóstico da enfermidade nos rebanhos leiteiros, tanto na detecção da infecção individual quanto na detecção e no monitoramento das infecções em rebanhos com a utilização de amostras de leite de conjunto (BEAUDEAU et al., 2001).

Além da VN e do ELISA, outros testes sorológicos também são empregados no diagnóstico do BVDV, como imunodifusão em gel de ágar, fixação de complemento, imunofluorescência indireta e “Western blotting”. Os testes de imunodifusão em gel de ágar e de fixação de complemento detectam anticorpos contra o antígeno da proteína NS2-3, porém a sensibilidade desses testes é baixa (EDWARDS, 1990; SANDVIK, 1999; SALIKI & DUBOVI, 2004).

Os anticorpos detectados pelo teste de VN são predominantemente contra a glicoproteína E2, onde estão presentes as diversidades nos determinantes antigênicos do BVDV (GOENS, 2002; BROCK, 2003; SANDVIK, 2005). As diferenças nos resultados dos testes de VN apresentados pelos laboratórios são consequências dessas diversidades, e a principal razão dessas discordâncias são as diferentes estirpes utilizadas nos laboratórios (EDWARDS & PATON, 1995; SALIKI & DUBOVI, 2004).

Portanto, para uma mesma amostra de soro sangüíneo, podem ser encontrados diferentes títulos de anticorpos, dependendo da estirpe utilizada no teste de VN. Por essa razão, não devem ser comparados os títulos de anticorpos encontrados no soro sangüíneo de um animal na fase aguda da enfermidade com os títulos de anticorpos encontrados na fase convalescente oriundos de testes realizados em laboratórios diferentes (DUBOVI, 1996).

Desta maneira, deveriam ser empregadas nos testes de VN estirpes citopatogênicas (CP) de amostras locais do BVDV ou de estirpes tradicionais do vírus, como as estirpes NADL e Singer do BVDV 1, por serem estirpes que favorecem a leitura e a interpretação dos resultados devido à característica de alta citopatogenicidade (EDWARDS & PATON, 1995; BROCK, 1995; SANDVIK, 2005).

Além das diferentes estirpes do BVDV, outros fatores também promovem divergências nos resultados dos testes de VN, como as linhagens celulares utilizadas, a quantidade de doses infectantes e o tempo de incubação da reação que são empregados pelos laboratórios. As divergências dos resultados apresentados por esses laboratórios são reflexos da falta de padronização da reação de VN (CHASE et al., 2003; KAPIL et al., 2005).

A baixa reatividade sorológica cruzada entre o BVDV 1 e o BVDV 2 também pode interferir no diagnóstico sorológico (EDWARDS & PATON, 1995). Os laboratórios podem fornecer diagnósticos falsos quando o teste de VN for realizado apenas para o BVDV 1 (CHASE et al., 2003). Por isso, além do BVDV 1, também devem ser realizados testes de VN para o BVDV 2 (SANDVIK, 2005). Para FULTON et al. (2003), além da utilização de ambos os genótipos, são necessárias as inclusões dos subgenótipos BVDV 1a e BVDV 1b nos testes de VN.

As diferenças antigênicas existentes entre os genótipos do BVDV interferem na prevenção e no controle da enfermidade. As conseqüências da baixa reatividade sorológica cruzada ficaram evidentes quando um animal que havia sido imunizado com uma vacina inativada contendo apenas o BVDV 1 gerou um bezerro PI com o BVDV 2 (BOLIN & RIDPATH, 1996).

A infecção de animais imunocompetentes estimula a produção de anticorpos que fornecem proteção cruzada contra a infecção por outras estirpes. Mesmo assim, o BVDV consegue atravessar a placenta e o feto pode permanecer susceptível à infecção, embora a vaca gestante esteja protegida pelos anticorpos de proteção cruzada (BROCK, 2003).

FULTON et al. (1997) analisaram três amostras de soro sangüíneo de bovinos experimentalmente infectados, pelo BVDV 1 e pelo BVDV 2, em testes de VN empregando 15 estirpes do BVDV 1 e cinco estirpes do BVDV 2. As amostras neutralizaram todas as estirpes, entretanto os títulos de anticorpos neutralizantes foram variáveis dependendo das estirpes utilizadas no teste. No soro sangüíneo de um dos bovinos, os títulos de anticorpos variaram de 512 a 4.096 para o BVDV 1 e de 64 a 256 para o BVDV 2. No outro bovino, os títulos de anticorpos variaram de 8.192 a 32.768 para o BVDV 1 e de 4.096 a 16.384 para o BVDV 2. O terceiro bovino apresentou títulos de anticorpos que variaram de 1.024 a 8.192 para o BVDV 1 e de 2.048 a 16.384 para o BVDV 2.

JONES et al. (2001) detectaram anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1a, o BVDV 1b e o BVDV 2 em três grupos de bovinos que receberam três diferentes tratamentos. Um deles foi imunizado com uma vacina viva contendo o BVDV 1a, outro foi infectado experimentalmente com o BVDV 1b, e o terceiro grupo também foi infectado experimentalmente, mas com o BVDV 2. Na análise dos resultados, todos os bovinos dos diferentes grupos foram reagentes para as três estirpes testadas, porém os títulos de anticorpos dos bovinos de cada grupo eram bem maiores contra as estirpes homólogas infectante ou vacinal.

Na pesquisa sobre a variabilidade antigênica e genética das estirpes do BVDV isoladas na Bélgica por COUVREUR et al. (2002), todas as estirpes pertencentes ao BVDV 1 eram antigenicamente distintas das estirpes pertencentes ao BVDV 2 nos testes de VN. Entretanto, não foram verificadas diferenças na análise estatística que comparou os títulos de anticorpos dos animais infectados pelas estirpes pertencentes ao BVDV 1, quando testados frente aos subgenótipos BVDV 1a e BVDV 1b.

A variabilidade antigênica do BVDV é utilizada em estudos epidemiológicos na determinação da origem de estirpes isoladas em surtos de diarreia viral bovina (BVD), e a variabilidade das glicoproteínas do envelope viral utilizada nos estudos dos determinantes antigênicos, os quais estão relacionados à VN. Contudo, essas variabilidades afetam a especificidade e a sensibilidade dos testes imunológicos utilizados no diagnóstico laboratorial do BVDV (BOTTON et al., 1998).

5.3 OBJETIVOS

Comparar os resultados e os títulos de anticorpos neutralizantes dos testes de VN contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2 em rebanhos bovinos naturalmente infectados.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Amostras

Entre os meses de janeiro de 2005 e junho de 2007, foram colhidas 1.925 amostras de sangue de bovinos não vacinados contra o BVDV provenientes de 27 rebanhos de exploração leiteira ou de corte de variados tipos de manejo, sistemas de produção, tamanho, raça e produtividade. Os procedimentos utilizados na colheita, no processamento e no armazenamento das amostras de soro sangüíneo estão descritos no item 2.4.2 do Capítulo 2.

Os rebanhos estavam localizados nos Municípios de Machado, Poço Fundo e São Gonçalo do Sapucaí, Estado de Minas Gerais, e nos Municípios de Jaboticabal, Monte Alto, Sertãozinho, São Carlos, Guariba, Pedregulho, Olímpia, São José do Rio Preto, Cristais Paulista, Buritizal e Rifaina, Estado de São Paulo.

Em todos os rebanhos, foram colhidas entre 10 e 20 amostras de sangue de bovinos de diferentes faixas etárias. Porém, em quatro desses rebanhos foram realizadas outras colheitas em períodos distintos, sendo colhidas entre 9 e 336 amostras, conforme a colheita. A identificação, a localização, o número de amostras e de colheitas por rebanho estão demonstrados na Tabela 12.

5.4.2 Teste de virusneutralização - VN

Todas as amostras foram submetidas ao teste de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 (OIE, 2007). As amostras foram testadas em duplicata com diluições sucessivas do soro sangüíneo de 1:10 até 1:5.120, conforme o protocolo descrito no item 2.4.3 do Capítulo 2. As amostras reagentes na diluição 1:5.120 foram novamente testadas em duplicata até a diluição 1:20.480.

5.4.3 Análise estatística

Os resultados encontrados nos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 foram comparados pelo Teste de McNemar, por meio de amostras pareadas em escala nominal, e com intervalo de confiança de 95% (ZAR, 1999). A medida de correlação não paramétrica entre os resultados foi analisada pelo coeficiente de concordância “kappa” (κ) (THRUSFIELD, 2004).

A comparação dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o BVDV 1 e contra o BVDV 2 foi realizada pelo Teste de Wilcoxon, com intervalo de confiança de 95% (ZAR, 1999).

Tabela 12. Localização dos rebanhos, número de colheitas realizadas por rebanho e número total de amostras de soro sanguíneo de bovinos utilizadas na comparação dos resultados dos testes de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2

Rebanho	Localização	Estado	Número de colheitas	Número de amostras
1	Machado	MG	6	1.057
2	São Gonçalo do Sapucaí	MG	1	20
3	São Gonçalo do Sapucaí	MG	1	10
4	Poço Fundo	MG	5	259
5	Poço Fundo	MG	3	90
6	Machado	MG	1	10
7	São José do Rio Preto	SP	1	10
8	Jaboticabal	SP	1	20
9	Sertãozinho	SP	1	12
10	São Carlos	SP	1	10
11	São Carlos	SP	1	10
12	Jaboticabal	SP	1	25
13	Jaboticabal	SP	1	10
14	Guariba	SP	1	28
15	Guariba	SP	1	10
16	Guariba	SP	1	10
17	Pedregulho	SP	3	226
18	Pedregulho	SP	1	10
19	Cristais Paulista	SP	1	10
20	Buritizal	SP	1	10
21	Pedregulho	SP	1	12
22	Buritizal	SP	1	10
23	Buritizal	SP	1	10
24	Cristais Paulista	SP	1	10
25	Monte Alto	SP	1	10
26	Rifaina	SP	1	10
27	Olímpia	SP	1	16
Total de amostras colhidas				1.925

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Teste de VN

Na Tabela 13 estão sumarizados os resultados dos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 de todos os rebanhos analisados, assim como a média geométrica dos títulos de anticorpos encontrados nas amostras reagentes. Do total de 1.925 amostras de soro sangüíneo, 1.209 (62,8%) foram reagentes tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, 51 (2,65%) reagiram apenas ao BVDV 1 e 67 (3,49%) reagiram apenas ao BVDV 2. Os títulos de anticorpos neutralizantes das amostras reagentes ao BVDV 1 variaram de 10 a 20.480, e ao BVDV 2 variaram de 10 a 10.240.

5.5.2 Análise estatística

Na análise realizada pelo teste de McNemar, não foi verificada discordância na proporção de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 ($p > 0,05$). Pelo coeficiente de concordância κ , a correlação entre bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 foi muito boa ($\kappa = 0,8614$).

No entanto, na comparação dos títulos de anticorpos das amostras reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2, realizada pelo Teste de Wilcoxon, houve discordância entre os títulos de anticorpos detectados contra os genótipos do BVDV ($p < 0,0001$).

Tabela 13. Número de bovinos reagentes ao BVDV 1, número de bovinos reagentes ao BVDV 2, número de bovinos reagentes tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, bem como a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes das amostras reagentes colhidas em 27 rebanhos entre os meses de janeiro de 2005 e julho de 2007

Amostras reagentes									
Rebanho	Número total de amostras	BVDV 1			BVDV 2			BVDV 1 e BVDV 2	
		n ^a	Média dos títulos de anticorpos ^b	n ^a	Média dos títulos de anticorpos ^b	n ^a	Média dos títulos de anticorpos (BVDV 1) ^b	Média dos títulos de anticorpos (BVDV 2) ^b	
1	1.057	30	26	34	19	700	140	98	
2	20	0	0	1	80	12	90	143	
3	10	0	0	1	14	1	20	453	
4	259	1	10	2	160	233	637	808	
5	90	2	10	9	14	58	36	51	
6	10	0	0	0	0	4	269	95	
7	10	1	10	2	12	2	57	56	
8	20	0	0	0	0	0	0	0	
9	12	0	0	0	0	1	1280	320	
10	10	0	0	1	10	2	14	57	
11	10	0	0	0	0	0	0	0	
12	25	2	113	0	0	1	40	10	
13	10	0	0	0	0	2	14	14	
14	28	0	0	0	0	5	211	121	
15	10	0	0	0	0	2	226	67	
16	10	2	40	0	0	3	254	359	
17	226	11	12	12	12	143	88	44	
18	10	0	0	0	0	1	20	40	
19	10	0	0	0	0	2	320	190	
20	10	0	0	1	40	6	427	302	
21	12	1	10	0	0	6	180	50	
22	10	0	0	1	10	2	113	134	
23	10	0	0	0	0	3	45	453	
24	10	0	0	2	14	0	0	0	
25	10	0	0	0	0	4	57	34	
26	10	0	0	0	0	5	184	53	
27	16	1	80	1	14	11	170	75	
Total	1.925	51 (2,65%)		67 (3,49%)		1209 (62,8%)			

^a Número de amostras reagentes

^b Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes das amostras reagentes

5.6 DISCUSSÃO

Nos resultados encontrados nos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2, verificou-se que de 1.925 amostras de soro sangüíneo, 108 (6,14%) foram reagentes apenas a um dos genótipos do BVDV. Resultados falso-negativos seriam obtidos (CHASE et al., 2003; SANDVIK, 2005) se 67 amostras (3,49%) tivessem sido submetidas apenas ao teste de VN para o BVDV 1 e 51 amostras (2,65%) apenas ao BVDV 2.

No entanto, a proporção de animais reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 foi a mesma pelo Teste de McNemar, e a correlação desses resultados pelo coeficiente κ de concordância foi considerada muito boa. Porém, as análises estatísticas foram realizadas com dados que não apresentavam uma distribuição normal, além do fato do número de amostras analisadas por rebanho não ter sido o mesmo, pois variou de 10 a 1.057 amostras.

Na comparação dos títulos de anticorpos neutralizantes para o BVDV 1 e para o BVDV 2, realizada pelo Teste de Wilcoxon, houve discordância entre os títulos de anticorpos encontrados nas amostras reagentes aos diferentes genótipos do BVDV, demonstrando assim a variabilidade antigênica existente entre eles (EDWARDS & PATON, 1995; BOLIN & RIDPATH, 1996; DUBOVI, 1996; RIDPATH, 2003). O estudo realizado por COUVREUR et al. (2002) também verificou nos testes de VN que as estirpes do BVDV isoladas na Bélgica pertencentes ao BVDV 1 eram antigenicamente distintas das estirpes pertencentes ao BVDV 2.

Os rebanhos que apresentaram bovinos reagentes ao BVDV poderiam estar em diferentes estágios da infecção, já que os anticorpos contra o vírus podem ser detectados no soro sangüíneo 21 dias após a infecção (CHASE et al., 2003) e permanecem detectáveis pelo menos por três anos (FREDRIKSEN et al., 1999). Os títulos de anticorpos resultantes de uma infecção antiga vão declinando com o tempo (KAPIL et al., 2005) e provavelmente a baixa reatividade cruzada entre o BVDV 1 e o BVDV 2 (EDWARDS & PATON, 1995) foi suficiente para que algumas das amostras

tivessem sido reagentes apenas a um dos genótipos, tanto é que na maioria delas, a média dos títulos de anticorpos foi baixa (Tabela 13).

A baixa reatividade cruzada entre o BVDV 1 e o BVDV 2 também foi demonstrada nas pesquisas realizadas por FULTON et al. (1997) e JONES et al. (2001). Nessas pesquisas, todos os bovinos apresentaram anticorpos neutralizantes contra ambos os genótipos do BVDV, porém os títulos foram bem maiores contra as estirpes homólogas às estirpes infectantes utilizadas nos testes de VN. Os altos títulos de anticorpos detectados, principalmente no estudo realizado por FULTON et al. (1997), podem ser justificados pela realização dos testes de VN pouco tempo após a infecção experimental dos animais analisados.

A mesma condição pôde ser verificada nesta pesquisa, especificamente no rebanho 4. Esse foi um dos rebanhos em que foram realizadas mais de uma colheita de amostras de sangue, e nele também foram detectados dois animais PI. Em três das cinco colheitas realizadas, todos os animais do rebanho que reagiram ao BVDV 1 também reagiram ao BVDV 2, mas apresentaram diferentes títulos de anticorpos nos testes de VN. Os animais desse rebanho eram mantidos num mesmo lote, e provavelmente os altos títulos de anticorpos detectados eram provenientes de uma infecção recente, pois os animais PI tinham menos de seis meses de idade, ou eram devido ao constante estímulo do BVDV eliminado por esses mesmos animais PI.

Nas amostras que foram reagentes tanto ao BVDV 1 quanto ao BVDV 2, as médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes contra cada genótipo, apresentaram de forma heterogênea entre os rebanhos analisados. Em alguns deles as médias foram semelhantes, e em outros as médias foram superiores para um determinado genótipo, apresentando também intervalos variáveis entre os títulos de anticorpos detectados para cada genótipo do BVDV (Tabela 13).

Esses resultados demonstraram a variabilidade antigênica do vírus (RIDPATH, 2003), que contribui para os diferentes resultados apresentados pelos laboratórios que realizam testes de VN para o BVDV (EDWARDS & PATON, 1995; CHASE et al., 2003; SALIKI & DUBOVI, 2004; KAPIL et al., 2005).

Considerando essa diversidade antigênica do BVDV, alguns pesquisadores enfatizaram a necessidade da utilização de estirpes do BVDV 1 e do BVDV 2 nos testes de VN, pois para uma mesma amostra de soro sanguíneo podem ser encontrados diferentes resultados (DUBOVI, 1996; CHASE et al., 2003; FULTON et al., 2003; SANDVIK, 2005).

FULTON et al. (2003) também enfatizaram que é necessária a utilização de estirpes dos subgenótipos 1a e 1b do BVDV 1 nos testes de VN. Entretanto, no estudo realizado por COUVREUR et al. (2002), não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos nos testes de VN para esses mesmos subgenótipos.

Apesar das análises estatísticas realizadas neste estudo terem demonstrado que a proporção de animais reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 foi a mesma, a parcela de animais reagentes apenas a um dos genótipos do BVDV foi de importância epidemiológica, pois demonstrou a exposição desses animais ao vírus (FLORES, 2003). Além disso, essa observação também foi pertinente quando considerado o diagnóstico da infecção por rebanhos, pois no rebanho 24 (Tabela 13) foram detectados animais reagentes apenas ao BVDV 2.

A falta de padronização dos testes de VN para o BVDV (CHASE et al., 2003; KAPIL et al., 2005), a diversidade genética e antigênica das estirpes (RIDPATH, 2003) e a interpretação dos resultados são fatores que interferem no diagnóstico sorológico da BVD nos rebanhos. Além disso, são necessários estudos que demonstrem qual o limiar em que as diferenças dos títulos de anticorpos neutralizantes entre os genótipos do BVDV influenciariam o diagnóstico de rebanhos verdadeiramente infectados.

5.7 CONCLUSÕES

- Nos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2, nem todos os animais reagentes a um genótipo do BVDV também foram reagentes ao outro genótipo;
- Não houve discordância entre a proporção de bovinos reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2;

- Houve discordância entre os títulos de anticorpos apresentados pelos animais reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2;
- Os animais reagentes apenas a um dos genótipos demonstraram a exposição ao BVDV, portanto foram importantes do ponto de vista epidemiológico.

5.8 REFERÊNCIAS

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

BEAUDEAU, F.; BELLOC, C.; SEEGER, H.; ASSIÉ, S.; SELLAL, E.; JOLY, A. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 329-337, 2001.

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

BOTTON, S.; SILVA, A. M.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross- neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 11, p. 1429-1438, 1998.

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

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

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

CHASE, C. C. L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 95-114, 2004.

COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; COLLARD, A.; QUENON, P.; DEHAN, P.; HAMERS, C.; PASTORET, P. P.; KERKHOF, P. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. **Virus Research**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 17-28, 2002.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 9, p. 867-872, 1996.

EDWARDS, S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 9, n. 1, p. 115-130, 1990.

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

FLORES, E.F. Vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **O Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1-2, p. 3-9, 2003.

FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S. A. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. **The Veterinary Record**, London, v. 144, n. 5, p. 111-114, 1999.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 89-95, 2003.

FULTON, R. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; d'OFFAY, J. M.; BOLIN, S. R.; MAES, R. K.; BAKER, J. C.; FREY, M. L. Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 4, n. 3, p. 380-383, 1997.

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

JONES, L.; VAN CAMPEN, H.; XU, Z. C.; SCHNACKEL, J. A. Comparison of neutralizing antibodies to type 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus from experimentally infected and vaccinated cattle. **The Bovine Practitioner**, Stillwater, v. 35, n. 2, p. 137-140, 2001.

KAPIL, S.; WALZ, P.; WILKERSON, M.; MINOCHA, H. Immunity and immunosuppression. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 9, p. 157-170.

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

OIE. Office International des Épizooties. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Paris. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00132.htm>. Acesso em: 30 ago. 2007.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p.127-131, 2003.

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 69-83, 2004.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.

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

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.

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

CAPÍTULO 6 - MONITORAMENTO DA INFECÇÃO NATURAL PELO BVDV EM REBANHOS BOVINOS

RESUMO – A infecção natural pelo BVDV foi monitorada em três diferentes rebanhos bovinos por períodos que variaram de 17 a 29 meses. Durante o monitoramento, dois rebanhos não adotaram medidas específicas para o controle da enfermidade, porém num dos rebanhos foi utilizada a vacinação de todos os animais com idade superior a oito meses. O monitoramento foi realizado por meio de várias colheitas de amostras de sangue dos animais de cada rebanho e, as amostras de soro sangüíneo obtidas foram submetidas aos testes de virusneutralização para o BVDV 1 e para o BVDV 2. As amostras que não foram reagentes a pelo menos um dos genótipos e aquelas oriundas de bovinos com menos de seis meses de idade, foram analisadas pela RT-PCR para a pesquisa do BVDV. Em dois rebanhos, o BVDV não foi detectado em nenhuma amostra analisada e a quantidade de animais reagentes ao vírus, principalmente os animais jovens, diminuiu à medida que as colheitas foram realizadas, sugerindo, portanto, a eliminação do BVDV nesses rebanhos. No entanto, no outro rebanho, a fonte de infecção permaneceu durante o período monitorado, pois o BVDV foi detectado em dois animais persistentemente infectados e também em um animal transitoriamente infectado. A dinâmica da infecção pelo BVDV foi variável nos rebanhos analisados e o sistema de criação, bem como o trânsito de animais, foram favoráveis para a permanência da infecção num dos rebanhos. Porém, a comercialização de animais, comum aos três rebanhos analisados, possivelmente contribuiu para a disseminação da infecção para outros rebanhos.

Palavras-chave: animal persistentemente infectado, animal transitoriamente infectado, BVDV, eliminação espontânea, infecção natural, monitoramento

6.1 INTRODUÇÃO

A condição básica para a permanência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) num rebanho é a existência de animais persistentemente infectados (PI), mas a co-existência de animais transitoriamente infectados (TI) e de animais susceptíveis também favorece a permanência do vírus no rebanho.

Alguns rebanhos apresentam muitos animais adultos reagentes ao BVDV. Entretanto, os anticorpos contra o vírus permanecem no soro sanguíneo por um longo período após a infecção aguda, mas a detecção de animais reagentes não representa a detecção do vírus no animal. Sendo assim, a presença da infecção pelo BVDV nos rebanhos pode ser evidenciada pela pesquisa de anticorpos nos animais jovens ou naqueles susceptíveis recém-introduzidos no rebanho.

A diarreia viral bovina (BVD) pode ser controlada pelo uso de vacinas, porém o principal objetivo no controle da enfermidade é a eliminação do animal PI. No estabelecimento do conjunto de medidas de controle da BVD, também é importante a consideração dos fatores de risco associados à infecção pelo BVDV.

Os rebanhos bovinos nacionais são caracterizados pelo intenso trânsito de animais. A comercialização de animais é muito ativa e, na maioria desses rebanhos, ao mesmo tempo em que alguns animais jovens ou adultos estão sendo introduzidos, outros estão sendo retirados. Esse trânsito de animais entre os rebanhos é extremamente favorável à disseminação do BVDV.

6.2 REVISÃO DE LITERATURA

O BVDV ocorre em muitos rebanhos bovinos causando prejuízos econômicos sem despertar qualquer suspeita do proprietário ou do médico veterinário (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004). Porém, esses prejuízos são difíceis de serem quantificados, devido aos poucos sinais clínicos que são apresentados pela enfermidade na maioria das infecções, assim como pela dinâmica variável da infecção nas populações bovinas (SANDVIK, 2004).

O impacto da infecção pelo BVDV em rebanhos leiteiros é rapidamente percebido pela redução da produção leiteira e pelo aumento da ocorrência de infecções secundárias ou oportunistas (BROCK, 2004; KOZASA et al., 2005). Em rebanhos de corte, os primeiros sinais da infecção são notados na maior ocorrência de afecções respiratórias em bezerros (BROCK, 2004; KENNEDY, 2006).

Segundo SANDVIK (2004), em áreas endêmicas com alta densidade populacional bovina, onde o vírus dissemina-se com mais facilidade, os prejuízos econômicos causados pelo BVDV são considerados moderados, mas permanecem constantes. No entanto, quando o vírus infecta rebanhos livres da enfermidade, as consequências são rapidamente notadas, principalmente na ocorrência de transtornos reprodutivos.

Para o controle do BVDV devem ser adotadas medidas de biossegurança (“biosecurity”) nos rebanhos não infectados, visando prevenir a entrada do vírus, e medidas biorrestritivas (“biocontainment”) em rebanhos onde existe a infecção, com a remoção dos animais PI, a promoção do aumento da imunidade dos animais e a prevenção do contato entre bovinos susceptíveis e infectados (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

O principal objetivo de qualquer medida de controle do BVDV é a prevenção da infecção uterina pela identificação e eliminação dos animais PI do rebanho (GREISER-WILKE et al., 2003). Para o BVDV persistir num rebanho é necessário que um animal PI induza a geração de pelo menos um outro animal PI (LINDBERG & HOUE, 2005).

Num rebanho infectado pelo BVDV, existem duas potenciais fontes de infecção: o bovino PI e o bovino TI (HOUE, 1994; LINDBERG & HOUE, 2005). Os bovinos PI são considerados a principal fonte de infecção do BVDV, pois eliminam constantemente por toda a vida uma grande quantidade do vírus em secreções e excreções (HOUE, 1995).

A eliminação do vírus pelos animais TI geralmente dura poucos dias ou eventualmente semanas (THURMOND, 2005), porém esses animais podem promover a permanência do vírus no rebanho na ausência de animais PI (MOERMAN et al., 1993), interferindo assim nas estratégias para o controle da enfermidade (MOEN et al., 2005). Os animais TI são considerados importantes fontes de infecção quando existe um constante trânsito de animais na propriedade (TREMBLAY, 1996).

No estabelecimento da profilaxia da BVD devem ser consideradas as diferenças existentes entre os rebanhos leiteiros e os rebanhos de corte (BROCK, 2004). A epidemiologia do BVDV nos rebanhos de corte, em que vacas e bezerros convivem constantemente, difere da epidemiologia nos rebanhos leiteiros devido à separação dos bezerros logo após o nascimento. Além disso, os nascimentos de bezerros nos rebanhos de corte estão restritos a um determinado período, enquanto nos rebanhos leiteiros ocorrem durante todo o ano (GUNN et al., 2004).

Nos rebanhos de corte, os bezerros são mantidos junto às mães durante a estação de cobertura. Os bezerros somente serão separados no período da desmama, quando suas mães já estarão gestantes, favorecendo assim tempo e oportunidade para que ocorra o contato entre o bezerro PI e um animal gestante durante os primeiros 125 dias de gestação, que são críticos para a geração do animal PI. Dessa forma, os animais PI mantêm a infecção no rebanho (WITTUM et al., 2001).

A separação dos bezerros dos animais gestantes é bem mais fácil nos rebanhos leiteiros. Além disso, na maioria desses rebanhos, os bezerros machos são descartados logo após o nascimento (LINDBERG & ALENIUS, 1999). Outras vantagens apresentadas para o controle da enfermidade nos rebanhos leiteiros são a disponibilidade e a praticidade na obtenção das amostras de leite para a detecção do BVDV ou de anticorpos contra o vírus (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

No Canadá, durante os anos de 1991 a 1995, a ocorrência da BVD foi duas vezes maior em rebanhos de corte do que em rebanhos de leite (ALVES et al., 1996). A expectativa na detecção de animais PI em rebanhos leiteiros é de 1% a 2%, mas nos rebanhos de corte, o número de animais PI pode ser considerado maior (DUBOVI, 1996).

Na pesquisa realizada por WITTUM et al. (2001), muitos dos rebanhos de corte analisados nos Estados Unidos apresentaram mais de um bezerro PI. Os autores também concluíram que a geração de bezerros PI não é uma ocorrência rara, porém a alta mortalidade neonatal impede que muitos deles possam ser detectados.

O BVDV pode permanecer num rebanho por várias gerações pela infecção transplacentária, desde que existam animais susceptíveis no início da gestação. Na ausência dessa condição, a circulação viral continua ocorrendo entre outros animais susceptíveis não gestantes até o momento em que a infecção cessa nesses animais TI, pois os mesmos desenvolvem resistência e debelam o vírus (MOERMAN et al., 1993; LINDBERG & ALENIUS, 1999; SANDVIK, 2004).

Nos rebanhos em que a BVD é endêmica, a infecção de bezerras até seis meses de idade confere proteção suficiente de anticorpos durante a puberdade, e ao tornarem-se novilhas aptas à reprodução, a imunidade adquirida será suficiente para protegê-las da ação do BVDV na fertilidade e também impedir que ele infecte o feto (MUÑOZ-ZANZI et al., 2004).

Como os títulos de anticorpos para o BVDV após uma infecção natural são de longa duração, pode ocorrer nos rebanhos a eliminação espontânea do BVDV sem qualquer intervenção técnica. Essa eliminação, também denominada “self-clearance”, resultaria da diminuição dos animais susceptíveis ou da remoção dos animais PI do rebanho (LINDBERG & ALENIUS, 1999).

O fenômeno do “self-clearance” parece ser mais comum em rebanhos pequenos, nos quais o vírus pode infectar todos os animais antes que eles alcancem a idade reprodutiva. Em rebanhos maiores, também pode ocorrer esse fenômeno quando existe pouca movimentação de animais ou separação do rebanho em lotes (LINDBERG & HOUE, 2005). Nos rebanhos leiteiros, a separação dos bezerros logo após o

nascimento e o descarte dos bezerros machos favorecem a “self-clearance” (LINDBERG & ALENIUS, 1999).

HOUE (1995) propôs cinco diferentes estágios da infecção pelo BVDV nos rebanhos: no primeiro estágio, uma pequena porcentagem dos animais é reagente devido à infecção recente, e não há a presença de animais PI. No segundo estágio, anticorpos são detectados porque os animais PI estão presentes e com idade inferior a 3 ou 4 meses. Nesse caso, a maioria dos animais apresenta uma infecção aguda, e a quantidade de animais reagentes vai depender da disseminação do vírus ou do sistema de criação dos bovinos. Já no terceiro estágio, mais do que 90% dos animais são reagentes, e no rebanho existem animais PI com idade superior a quatro meses. No quarto estágio, a infecção não está mais presente nos rebanhos, pois os animais PI foram removidos recentemente. Nesse estágio, os bezerros podem ser reagentes até 6 a 8 meses de idade, devido à imunidade colostrar. E no quinto estágio, nos rebanhos cujos animais PI foram removidos há um determinado tempo, todos os bezerros, com exceção daqueles até seis meses de idade, e a maioria das vacas jovens não são reagentes.

A vacinação continua sendo a principal medida prática utilizada no controle do BVDV, apesar da maior compreensão da epidemiologia da enfermidade, especialmente no reconhecimento da importância dos animais PI e das infecções transplacentárias (SANDVIK, 2004). Uma vacina eficaz contra o BVDV deve proteger contra a viremia, evitando a disseminação do vírus no hospedeiro, e também impedir a infecção das células do sistema reprodutivo e linfático, conseqüentemente evitando a ocorrência da infecção fetal e da imunossupressão (KELLING, 2004).

O objetivo da vacinação nos rebanhos bovinos é a prevenção da infecção fetal, que é mais difícil prevenir do que a infecção aguda. Alguns experimentos mostraram que as vacinas não protegem completamente o feto, porém reduzem o nascimento de bezerros PI (BROCK, 2004; SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

As vacinas contra o BVDV podem ser inativadas ou vivas atenuadas. Algumas delas contêm somente o BVDV 1, outras também apresentam o BVDV 2 na sua constituição (KELLING, 2004). No Brasil, o mercado disponibiliza somente vacinas

inativadas, na maioria contendo apenas o BVDV 1, mas algumas também apresentam o BVDV 2 na sua composição (FLORES et al., 2005).

Na escolha do tipo de vacina a ser utilizada, devem ser analisados aspectos como a resposta imune induzida, a duração da imunidade, a ocorrência da reatividade cruzada, a proteção fetal, a indução da imunossupressão, a possibilidade da reversão da virulência, os efeitos de anticorpos maternos na resposta imune dos bezerros e a pureza da vacina (BOLIN, 1995; KELLING, 2004).

A vacina viva modificada apresenta a vantagem da ativação do sistema imune, estimulando a produção de altas concentrações de anticorpos neutralizantes e promovendo a resposta imune local, humoral e celular. Já a vacina inativada é segura, pois não promove a imunossupressão e não é patogênica para o feto, porém induz fraca resposta de anticorpos neutralizantes e de curto período de duração (BOLIN, 1995; van OIRSCHOT et al., 1999; KELLING, 2004).

Independente do tipo de vacina utilizada, algumas importantes questões estão associadas com a vacinação contra o BVDV, tais como a diversidade antigênica, a qualidade da vacina utilizada, a finalidade da vacinação, a presença de animais PI no rebanho e o uso incorreto e inconsistente das vacinas (MOENNIG et al., 2005).

Para os proprietários de rebanhos bovinos, é difícil compreender a correlação existente entre a aquisição de animais gestantes saudáveis e a ocorrência de surtos de BVD logo após o nascimento dos bezerros. A aquisição de vacas gestantes de fetos PI é o principal fator de risco associado com a introdução da enfermidade num rebanho (BROCK, 2004), pois essas vacas atuam como “Cavalo de Tróia” (LINDBERG et al., 2002).

O risco da aquisição de animais infectados provenientes de rebanhos pequenos é bem maior, quando comparado ao de médios e de grandes rebanhos. Em grande parte dos rebanhos pequenos, geralmente o plantel é formado com animais adquiridos de qualquer procedência (SOLIS-CALDERON et al., 2005). Outro fator de risco que favorece a exposição do rebanho ao BVDV é a transmissão pelo contato com rebanhos vizinhos, já que os animais são separados apenas pela cerca (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

QUINCOZES et al (2007) realizaram um estudo sobre os fatores associados à infecção pelo BVDV na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. Dentre as variáveis, foram analisados o tipo de exploração e o regime de criação dos rebanhos. Os rebanhos criados de forma extensiva e aqueles de exploração mista (corte e leite) apresentaram maior quantidade de animais reagentes quando comparados, respectivamente, aos rebanhos criados de forma semi-intensiva e aos rebanhos de criação exclusiva de leite ou de corte.

A principal medida de controle da BVD é a eliminação dos animais PI de um rebanho. Porém, ela apresenta um alto custo, pois devem ser analisados todos os animais do rebanho. Antes da realização dessa análise, deve ser verificada a evidência do BVDV no rebanho pelo isolamento prévio do vírus ou pela presença de anticorpos em animais não vacinados, principalmente nos animais jovens. O manejo e a existência do trânsito de animais no rebanho também devem ser considerados (DUBOVI, 1996). A interpretação dos resultados dos testes diagnósticos está relativamente ligada à epidemiologia da infecção pelo BVDV (HOUE, 1995).

O conceito sobre o controle da infecção causada pelo BVDV mudou desde a primeira descrição da enfermidade. Inicialmente, o controle era direcionado à prevenção dos prejuízos econômicos com base na vacinação profilática. A importância epidemiológica da eliminação de animais PI foi reconhecida somente nos primeiros programas de controle e erradicação da BVD implantados nos países escandinavos (MOENNIG et al., 2005).

Para a obtenção de sucesso no controle do BVDV, são necessários três requisitos: biossegurança, eliminação do vírus em rebanhos infectados e monitoramento para a detecção de novas infecções ou re-infecções. A vacinação não pode ser tida como uma medida única no controle da enfermidade, mas como um elemento opcional aos requisitos mencionados (LINDBERG & HOUE, 2005).

6.3 OBJETIVO

Monitorar a infecção natural pelo BVDV em rebanhos bovinos.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Rebanhos

Para o estudo foram utilizados três rebanhos com a presença sugestiva do BVDV, de acordo com a metodologia proposta por PILLARS & GROOMS (2002). Esses rebanhos, caracterizados na Tabela 14, apresentaram pelo menos três de cinco amostras de soro sangüíneo de bovinos com idade compreendida entre 6 e 12 meses reagentes ao BVDV 1 ou ao BVDV 2, e com títulos de anticorpos superiores a 128.

Em dois dos três rebanhos monitorados, rebanhos 1 e 4, não foram adotadas medidas para o controle da enfermidade. Durante o período do monitoramento, no terceiro rebanho (rebanho 17), foi realizada a vacinação de todos os animais com mais de oito meses de idade, utilizando uma vacina comercial inativada contendo o BVDV 1 e o BVDV 2. Após 30 dias da vacinação, foi realizado o reforço, e a revacinação feita anualmente.

Tabela 14. Caracterização dos rebanhos analisados no monitoramento da infecção natural pelo BVDV

Características	Rebanhos		
	1	4	17
Localização	Machado/MG	Poço Fundo/MG	Pedregulho/SP
Tipo de exploração	leiteira	corte	mista
Número total de animais*	336	72	94
Raça	holandesa	mestiça	girolando
Regime de criação	intensiva	extensiva	semi-intensiva

* Número de animais na ocasião da 1ª colheita das amostras

6.4.2 Amostras

Na primeira etapa, foram colhidas amostras de sangue pareadas, com intervalo de 30 dias entre as colheitas, de todos os animais nos três rebanhos do estudo. Nas etapas posteriores, foram realizadas as demais colheitas, em períodos distintos para cada rebanho, bem como a categoria dos animais pesquisados. No rebanho 1, foram realizadas cinco colheitas, durante um intervalo de 29 meses, totalizando 1.046 amostras colhidas; no rebanho 4, foram colhidas 249 amostras, em quatro colheitas feitas num intervalo de 19 meses; e no rebanho 17, no intervalo de 17 meses, foram colhidas 216 amostras, em três diferentes colheitas (Tabela 15).

Considerando todas as colheitas realizadas nos rebanhos pesquisados, foram obtidas no total 1.511 amostras de sangue (Tabela 15). A metodologia utilizada na colheita dessas amostras, na obtenção e no armazenamento das amostras de soro sangüíneo está apresentada no item 2.4.2 do Capítulo 2.

Tabela 15. Colheitas de amostras de sangue nos rebanhos 1, 4 e 17 conforme o intervalo de tempo (meses), a categoria e o número de animais analisados

Rebanho	Amostras	Colheitas					Total amostras/rebanho
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	
1	Intervalo (meses)*	0	1	16	17	29	
	Amostras (n)	336	333	257	109	11	1.046
	Animais analisados	Todo rebanho	Todo rebanho	Todo rebanho	Todos bovinos nascidos no intervalo entre a 2ª e 3ª colheita e aqueles com menos de 6 meses na 2ª colheita**	Amostragem de bovinos entre 6 e 12 meses de idade	
4	Intervalo (meses)*	0	1	7	19	-	
	Amostras (n)	72	76	92	09	-	249
	Animais analisados	Todo rebanho	Todo rebanho	Todo rebanho	Todos bovinos não reagentes na 3ª colheita	-	
17	Intervalo (meses)*	0	1	17	-	-	
	Amostras (n)	94	94	28	-	-	216
	Animais analisados	Todo rebanho	Todo rebanho	Todos bovinos com menos de 8 meses de idade***	-	-	
Total							1.511

(-) Colheita não realizada
* Intervalo (meses) referentes à 1ª colheita
** Amostras pareadas
*** Rebanho vacinado após a 2ª colheita, sendo colhidas amostras apenas dos animais não vacinados na 3ª colheita

6.4.3 Teste de virusneutralização - VN

Todas as amostras de soro sangüíneo foram submetidas ao teste de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 (OIE, 2007), testadas em duplicata com diluições sucessivas do soro sangüíneo de 1:10 até 1:5.120, conforme o protocolo apresentado no item 2.4.3 do Capítulo 2. As amostras que não apresentaram efeito citopatogênico (ECP) na última diluição testada, ou seja, na diluição 1:5.120, foram novamente submetidas ao teste de VN, porém diluídas até 1:20.480.

6.4.4 Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa – RT-PCR

Nas amostras de soro sangüíneo que não foram reagentes no teste de VN para o BVDV 1 ou para o BVDV 2, tanto as pareadas quanto as não pareadas, e nas amostras reagentes de bovinos com idade inferior a seis meses, foi pesquisada a presença do BVDV pela RT-PCR, conforme a metodologia descrita no item 3.4.5 do Capítulo 3.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Teste de VN

Os resultados dos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados em 1.511 amostras de soro sangüíneo dos rebanhos 1, 4 e 17, de acordo com a faixa etária e nas diferentes colheitas, estão apresentados respectivamente nas Tabelas 16, 17 e 18.

6.5.2 RT-PCR

A pesquisa do BVDV pela RT-PCR foi realizada em 566 amostras de soro sangüíneo que não foram reagentes ao BVDV 1, não reagentes ao BVDV 2 e de todos os bovinos com menos de seis meses de idade na ocasião da realização de cada colheita. Do total de amostras analisadas, 430 eram provenientes do rebanho 1, 36 do rebanho 4 e 100 do rebanho 17 (Tabela 19).

O BVDV foi detectado somente no rebanho 4. Nas amostras pareadas de soro sangüíneo da 1ª e 2ª colheitas, o vírus foi detectado em dois animais com menos de seis meses de idade, caracterizando a ocorrência de dois animais PI. Esses mesmos animais não foram reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2 no teste de VN. A fotografia do gel de agarose com a detecção dos produtos amplificados das amostras desses animais está apresentada no item 3.5.4 (Figura 1) do Capítulo 3.

Na 3ª colheita realizada no rebanho 4, o BVDV foi detectado em uma amostra de soro sangüíneo de um bovino com mais de 24 meses de idade. Posteriormente, a amostra desse mesmo bovino obtida na 4ª colheita foi reagente ao BVDV no Teste de VN, apresentando títulos de anticorpos (2560) contra o BVDV 1 e também contra o BVDV 2, caracterizando assim um animal TI (Figura 3).

Tabela 16. Resultado dos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados nas amostras de soro sanguíneo do rebanho 1, de acordo com a faixa etária, em tempos diferentes de colheitas

Faixa etária	BVDV	VN	Colheitas				
			1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
0-6 meses	Número total de amostras		39	42	23	34	3
	BVDV 1	Reagentes	24 (61,54%)	21 (50%)	12 (52,17%)	22 (64,70%)	0
		Não reagentes	15 (38,40%)	21 (50%)	11 (47,83%)	12 (35,30%)	3 (100%)
	BVDV 2	Reagentes	24 (61,54%)	21 (50%)	13 (56,52%)	24 (70,59%)	0
		Não reagentes	15 (38,40%)	21 (50%)	10 (43,48%)	10 (29,41%)	3 (100%)
6-12 meses	Número total de amostras		47	46	31	31	8
	BVDV 1	Reagentes	31 (65,96%)	28 (60,87%)	1 (3,23%)	1 (3,23%)	0
		Não reagentes	16 (34,04%)	18 (39,13%)	30 (96,77%)	30 (96,77%)	8 (100%)
	BVDV 2	Reagentes	30 (63,83%)	29 (63,04%)	1 (3,23%)	1 (3,23%)	0
		Não reagentes	17 (36,17%)	17 (36,96%)	30 (96,77%)	30 (96,77%)	8 (100%)
12-24 meses	Número total de amostras		65	64	52	44	-
	BVDV 1	Reagentes	51 (78,46%)	49 (76,56%)	9 (17,31%)	8 (18,18%)	-
		Não reagentes	14 (21,54%)	15 (23,44%)	43 (82,69%)	36 (81,82%)	-
	BVDV 2	Reagentes	48 (73,85%)	44 (68,75%)	9 (17,31%)	7 (15,90%)	-
		Não reagentes	17 (26,15%)	20 (31,25%)	43 (82,69%)	37 (84,10%)	-
> 24 meses	Número total de amostras		185	181	151	-	-
	BVDV 1	Reagentes	175 (94,60%)	174 (96,13%)	116 (76,82%)	-	-
		Não reagentes	10 (05,40%)	7 (03,87%)	35 (23,18%)	-	-
	BVDV 2	Reagentes	176 (95,14%)	170 (93,92%)	128 (84,77%)	-	-
		Não reagentes	09 (04,86%)	11 (06,08%)	23 (15,23%)	-	-
Total	Número total de amostras		336	333	257	109	11
	BVDV 1	Reagentes	281 (83,63%)	272 (81,68%)	138 (53,70%)	31 (28,44%)	0
		Não reagentes	55 (16,37%)	61 (18,32%)	119 (46,30%)	78 (71,56%)	11 (100%)
	BVDV 2	Reagentes	278 (82,74%)	264 (79,28%)	151 (58,75%)	32 (29,35%)	0
		Não reagentes	58 (17,26%)	69 (20,72%)	106 (41,25%)	77 (70,64%)	11 (100%)

(-) colheitas não realizadas nas respectivas faixas etárias.

Tabela 18. Resultado dos testes de VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2 realizados nas amostras de soro sanguíneo do rebanho 17, de acordo com a faixa etária, em tempos diferentes de colheitas

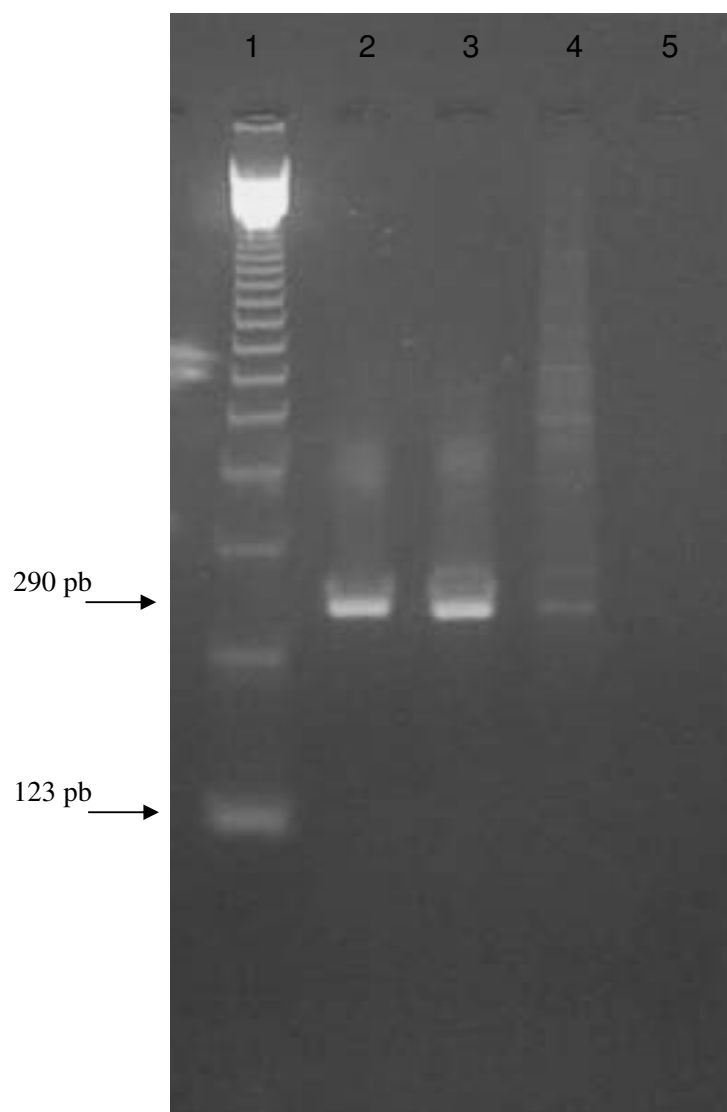
Faixa etária	BVDV	VN	Colheitas		
			1ª	2ª	3ª
0-6 meses	BVDV 1	Número total de amostras	9	10	17
		Reagentes	5 (55,56%)	6 (60%)	10 (58,82%)
	BVDV 2	Não reagentes	4 (44,44%)	4 (40%)	7 (41,18%)
		Reagentes	5 (55,56%)	6 (60%)	7 (41,18%)
6-12 meses	BVDV 1	Não reagentes	4 (44,44%)	4 (40%)	10 (58,82%)
		Reagentes	6	6	11
	BVDV 2	Reagentes	3 (50%)	3 (50%)	0
		Não reagentes	3 (50%)	3 (50%)	11 (100%)
12-24 meses	BVDV 1	Reagentes	2 (33,33%)	2 (33,33%)	0
		Não reagentes	4 (66,67%)	4 (66,67%)	11 (100%)
	BVDV 2	Número total de amostras	30	30	-
		Reagentes	17 (56,67%)	17 (56,67%)	-
> 24 meses	BVDV 1	Não reagentes	13 (43,33%)	13 (43,33%)	-
		Reagentes	19 (63,33%)	18 (60%)	-
	BVDV 2	Não reagentes	11 (36,67%)	12 (40%)	-
		Número total de amostras	49	48	-
Total	BVDV 1	Reagentes	42 (85,71%)	42 (87,50%)	-
		Não reagentes	7 (14,29%)	6 (12,50%)	-
	BVDV 2	Reagentes	45 (91,84%)	43 (89,58%)	-
		Não reagentes	4 (8,16%)	5 (10,42%)	-
Total	BVDV 1	Número total de amostras	94	94	28
		Reagentes	67 (71,28%)	68 (72,34%)	10 (35,71%)
	BVDV 2	Não reagentes	27 (28,72%)	26 (27,65%)	18 (64,29%)
		Reagentes	71 (75,53%)	69 (73,40%)	07 (25%)
Total	BVDV 2	Não reagentes	23 (24,46%)	25 (26,60%)	21 (75%)

(-) colheitas não realizadas nas respectivas faixas etárias.

Tabela 19. Total de amostras não reagentes na VN para o BVDV 1 e para o BVDV 2, total de amostras não reagentes na VN apenas para um dos genótipos e total de amostras de bovinos com menos de seis meses de idade analisadas pela RT-PCR em diferentes tempos de colheitas nos rebanhos monitorados para a infecção natural pelo BVDV

Rebanho	VN	Colheitas					Total	Total/rebanho
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª		
1	Não reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2	33	35	93	66	8	235	
	Não reagentes ao BVDV 1	7	5	16	0	0	28	430
	Não reagentes ao BVDV 2	10	13	2	1	0	26	
	Bovinos com menos de 6 meses de idade	39	42	23	34	3	141	
4	Não reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2	2	1	7	5	-	15	
	Não reagentes ao BVDV 1	0	0	0	0	-	0	36
	Não reagentes ao BVDV 2	0	0	2	0	-	2	
	Bovinos com menos de 6 meses de idade	7	11	1	0	-	19	
17	Não reagentes ao BVDV 1 e ao BVDV 2	16	16	11	-	-	43	
	Não reagentes ao BVDV 1	7	6	0	-	-	13	100
	Não reagentes ao BVDV 2	3	5	0	-	-	8	
	Bovinos com menos de 6 meses de idade	9	10	17	-	-	36	
Total								566

(-) colheitas não realizadas



Legenda: canaleta 1 – DNA *ladder* 123 pb Invitrogen[®]
canaleta 2 – estirpe citopatogênica BVDV 1 *Singer*
canaleta 3 – estirpe citopatogênica BVDV 2 VS-253
canaleta 4 – amostra 04/31 C
canaleta 5 – controle negativo (água ultrapura autoclavada)

Figura 3. Análise para a detecção do BVDV, por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, do produto (290 pb) amplificado pela RT-PCR em amostra de soro sangüíneo do rebanho 4

6.6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nas Tabelas 16, 17 e 18 relacionam os testes de VN para o BVDV 1 e o BVDV 2, respectivamente dos rebanhos 1, 4 e 17. Como os resultados encontrados nos testes de VN para ambos os genótipos não apresentaram diferenças significativas entre eles, não foi justificável, portanto, uma análise dos resultados para cada genótipo em cada rebanho. Desta maneira, foi feita uma análise geral considerando a infecção pelo BVDV.

Durante o período do monitoramento, foram encontrados diferentes resultados entre os rebanhos analisados, e pôde ser verificado que alguns fatores, como o sistema de criação dos rebanhos e a comercialização de animais, estiveram associados à presença da infecção pelo BVDV (QUINCOZES et al., 2007).

A pesquisa do BVDV pela RT-PCR foi realizada em 566 amostras provenientes dos três rebanhos monitorados (Tabela 19). Nos rebanhos 1 e 17, embora a exposição ao BVDV tenha sido evidenciada pelo diagnóstico sorológico, o vírus não foi detectado em nenhuma das fases do monitoramento. Ao contrário, no rebanho 4, o BVDV foi detectado mais de uma vez ao longo do estudo.

Analisando os rebanhos separadamente, no rebanho 1, a quantidade de animais reagentes ao BVDV nos testes de VN diminuiu à medida que as colheitas foram sendo realizadas. Nas duas primeiras colheitas, aproximadamente 80% dos animais foram reagentes ao BVDV, em torno de 53% dos animais foram reagentes na 3ª colheita, somente 28% foram reagentes na 4ª colheita e nenhum animal foi reagente na 5ª colheita.

Nas duas últimas colheitas não foram analisados todos os animais do rebanho nos testes de VN, sendo pesquisados anticorpos apenas nos animais mais jovens, também denominados sentinelas (PILLARS & GROOMS, 2002). Por outro lado, dentre os animais jovens que foram reagentes ao BVDV em todas as colheitas, estavam incluídos também aqueles com menos de seis meses de idade e os anticorpos detectados poderiam ser de origem colostrálica.

Os resultados dos testes de VN, realizados em todas as amostras de soro sangüíneo obtidas em cinco colheitas no rebanho 1 (Tabela 16), forneceram evidências da ocorrência do fenômeno “self clearance” do BVDV (LINDBERG & ALENIUS, 1999). A evidência da eliminação espontânea do vírus é reforçada principalmente pela não detecção da amplificação do genoma viral na RT-PCR, realizada em 430 amostras de soro sangüíneo que não tinham sido reagentes ao BVDV ou eram provenientes de bovinos com menos de seis meses de idade.

Além disso, todos os animais com mais de seis meses de idade na ocasião das duas primeiras colheitas, e que não foram reagentes ao BVDV, permanecerem não reagentes na 3ª colheita. Também tornaram-se não reagentes na 3ª colheita alguns animais com idade superior a seis meses que tinham sido reagentes nas duas primeiras colheitas, e que haviam apresentado baixos títulos de anticorpos.

A proporção de animais não reagentes entre as colheitas realizadas foi mais evidente quando analisados os animais jovens nas faixas etárias de 6 a 12 meses e de 12 a 24 meses. A quantidade de animais não reagentes nessas faixas etárias, principalmente nas três últimas colheitas, era bem maior em relação às duas primeiras. Especificamente na 5ª colheita, realizada apenas nos animais com até 12 meses de idade, nenhum animal foi reagente, sugerindo assim a ausência do BVDV no rebanho naquele momento (PILLARS & GROOMS, 2002).

Relacionando os resultados encontrados no rebanho 1 nos testes de VN aos estágios da infecção pelo BVDV propostos por HOUE (1995), sugeriu-se que nas duas primeiras colheitas, o rebanho 1 estava inserido no quarto estágio da infecção e possivelmente os animais PI teriam sido removidos próximo à ocasião dessas colheitas. No entanto, quando foi realizada a última colheita, provavelmente o rebanho já estaria inserido no quinto estágio, no qual os animais PI já teriam sido removidos há um determinado tempo.

A hipótese da remoção recente dos animais PI no rebanho 1, em relação às duas primeiras colheitas, justifica-se também pelo resultado da pesquisa da presença do BVDV no rebanho, realizada previamente às colheitas segundo a metodologia proposta por PILLARS & GROOMS (2002). Nesse resultado, quatro das cinco amostras de

bezerros sentinelas foram reagentes ao BVDV e com títulos de anticorpos superiores a 128, o que classificou o rebanho como detentor de pelo menos um animal PI.

A presença de anticorpos neutralizantes em bovinos reagentes na faixa etária de 0 a 6 meses pode ser de origem colostrar. Tanto é que, nas amostras pareadas da 1ª e 2ª colheitas provenientes de animais dessa idade, na maioria delas, notou-se títulos de anticorpos menores na 2ª colheita (dados não mostrados), inclusive com alguns animais já não mais reagentes.

Porém, em oito animais dessa mesma faixa etária, verificou-se que os títulos de anticorpos permaneceram constantes nas duas colheitas, sendo que em um dos bezerros o título de anticorpos foi quatro vezes maior na 2ª colheita. O grupo de animais com menos de seis meses de idade na 2ª colheita foi novamente submetido às colheitas de amostras pareadas (3ª e 4ª colheitas), e aqueles oito animais foram os únicos reagentes ao BVDV em ambas as colheitas.

Deste modo, em contraposição aos fatos mencionados anteriormente, a fonte de infecção estaria presente no rebanho na ocasião da realização da 1ª colheita, pois nessa época, 3 dos 8 bezerros tinham aproximadamente 30 dias de idade. Mas, provavelmente tal fonte de infecção seria um animal TI, pois caso fosse um animal PI, um número maior de animais teria sido infectado e conseqüentemente maior seria o número de bovinos reagentes ao BVDV.

Considerando o diagnóstico do BVDV pela RT-PCR, a possibilidade da detecção de animais PI é bem maior do que em animais TI, pois eles eliminam constantemente grande quantidade do vírus (HOUE, 1995). Já a eliminação do BVDV pelos animais TI é em pequena quantidade e dura poucos dias (MOERMAN et al., 1993; THURMOND, 2005). Talvez por esse motivo o BVDV não tenha sido detectado na RT-PCR em nenhuma amostra de soro sanguíneo nas duas primeiras colheitas.

Vários fatores puderam ter contribuído para a “self clearance” do BVDV no rebanho 1, como o óbito do animal PI, por exemplo. Além disso, como em muitos rebanhos leiteiros, os animais eram criados em lotes, o que restringia o contato entre todos os animais do rebanho (LINDBERG & HOUE, 2005); os bezerros machos eram descartados logo após o nascimento, e isso reduziria em 50% a probabilidade de um

novo animal PI ter sido inserido no rebanho (LINDBERG & ALENIUS, 1999; GUNN et al., 2004); e a imunidade adquirida nos animais jovens teria sido suficiente para a proteção da infecção fetal e a geração animais PI quando adultos (MUÑOZ-ZANZI et al., 2004).

A venda de parte do plantel de reposição desse rebanho era uma prática bastante comum. Por isso, outra hipótese seria que a comercialização de novilhas também pôde ter contribuído para a “self clearance” do BVDV, pois essas novilhas consistiam no segmento do rebanho com maiores chances de gestação de animais PI. Por serem jovens, a probabilidade de não ter tido contato com o vírus era bem maior quando comparada aos animais adultos, pois após a infecção natural os anticorpos adquiridos são de longa duração (LINDBERG & ALENIUS, 1999).

A característica da longa duração dos títulos de anticorpos nos animais (LINDBERG & ALENIUS, 1999) pôde ser verificada nos animais mais velhos do rebanho 1. Nas duas primeiras colheitas, todas as vacas com mais de cinco anos de idade foram reagentes ao BVDV, e aquelas entre 8 e 10 anos de idade foram os animais que possuíam maiores títulos de anticorpos dentre todos analisados (dados não mostrados). Algumas dessas vacas apresentaram títulos de anticorpos 20.480, sugerindo assim a remota presença do BVDV no rebanho, e esses altos títulos de anticorpos poderiam ser resultantes do estímulo constante promovido pelo vírus.

Em regiões endêmicas, os prejuízos econômicos causados pelo BVDV são considerados moderados, mas permanecem constantes (SANDVIK, 2004). Essa condição foi observada no rebanho 1, pois segundo o proprietário, a ocorrência de alterações reprodutivas, principalmente em novilhas, e a dificuldade na criação dos bezerros até seis meses de idade, devido a infecções pulmonares e entéricas, era um problema constante no rebanho. Provavelmente o BVDV seria o grande responsável por todos esses problemas.

O proprietário também informou que justamente aqueles oito bezerros, os quais mantiveram títulos de anticorpos constantes nas duas primeiras colheitas e foram os únicos animais da respectiva faixa etária reagentes ao BVDV na 3ª colheita, foram animais que apresentaram maior dificuldade na criação e tiveram atraso no

desenvolvimento em relação aos demais bezerros. É bem provável que todas as alterações ocorridas eram devidas à infecção pelo BVDV, que pode atuar não somente como agente primário, mas também como agente propiciador de infecções secundárias (BROCK, 2004; KOZASA et al., 2005).

Na análise do rebanho 4, verificou-se que a quantidade de animais reagentes ao BVDV foi superior a 90% em 3 das 4 colheitas realizadas, e quase alcançou a totalidade do rebanho na 2ª colheita, com 96% dos animais reagentes (Tabela 17). De acordo com a classificação proposta por HOUE (1995), esse rebanho estaria inserido no terceiro estágio da infecção pelo BVDV, pois mais do que 90% dos animais eram reagentes e no rebanho foram detectados animais PI com idade superior a quatro meses.

A pesquisa do BVDV pela RT-PCR foi realizada em 36 amostras provenientes desse rebanho, e o vírus foi detectado em cinco amostras. Especificamente, quatro eram provenientes das duas primeiras colheitas de dois animais com menos de seis meses de idade, sendo um deles uma bezerra e o outro, um bezerro. Ambos os animais eram PI (Figura 1 – item 3.5.4 – Capítulo 3), pois somente se insere nessa condição quando o BVDV é detectado em amostras provenientes do mesmo animal colhidas num intervalo de pelo menos três semanas (HOUE, 1995).

Na 3ª colheita, o BVDV também foi detectado numa amostra proveniente de um animal adulto que não havia apresentado anticorpos contra o vírus. Entretanto, na 4ª colheita, a amostra do mesmo animal apresentou anticorpos neutralizantes contra o vírus, e com título 2.560. Esse animal foi caracterizado como um animal TI, pois na 3ª colheita estava sofrendo a infecção aguda, depois conseguiu debelar o vírus e a imunidade foi detectada na colheita seguinte (MOERMAN et al., 1993; LINDBERG & ALENIUS, 1999; SANDVIK, 2004).

O rebanho 4 é um exemplar do típico rebanho bovino brasileiro, que tem como objetivo a criação extensiva de animais de corte de baixo valor zootécnico, onde todos os segmentos de animais convivem num mesmo lote, e apresentam poucos cuidados com os aspectos sanitários. Mas a principal característica do típico rebanho nacional é o trânsito de animais, a constante compra e venda de bovinos, o que torna intensa a

circulação de animais entre os rebanhos, e isso é muito favorável à disseminação do BVDV.

Os proprietários destes tipos de rebanhos não se preocupam com o motivo pelo qual as vacas ou novilhas não reproduzem satisfatoriamente. Se isso for um problema, a solução é a venda desses animais e a substituição por outros. A mesma despreocupação é atribuída ao fraco desenvolvimento dos bezerros: a aplicação de ivermectina é a solução para todos os problemas. Os fatos corroboram para que o BVDV ocorra em muitos rebanhos bovinos sem despertar qualquer suspeita e continue causando prejuízos econômicos (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

O rebanho 4 era constituído por animais provenientes de diferentes rebanhos, os quais comercializavam animais de qualquer procedência, e que também é um importante fator de risco na transmissão do BVDV (SOLIS-CALDERON et al., 2005). Os bezerros PI detectados nesse estudo eram filhos de duas novilhas provenientes de um desses rebanhos. Elas foram adquiridas um ano antes da realização da 1ª colheita e no momento da aquisição não estavam gestantes.

Portanto, a infecção dessas novilhas pelo BVDV ocorreu quando elas já estavam no rebanho 4. A fonte de infecção poderia ter sido um animal PI, que já estava presente no rebanho e porventura tivesse sido comercializado posteriormente, ou algum animal TI inserido ao rebanho no período em que estavam no início da gestação. Enfim, dentre todas as hipóteses, é fato que as novilhas foram infectadas nesse rebanho e houve a infecção transplacentária que culminou com o nascimento de dois bezerros PI.

Com relação ao número de animais não reagentes ao BVDV existentes na 1ª e na 2ª colheitas, com exceção dos dois animais PI que não foram reagentes ao vírus, uma vaca também não foi reagente e outra novilha não apresentou anticorpos na 1ª colheita, mas foi reagente na 2ª colheita. Esses resultados sugerem que a infecção de alguns animais do rebanho tenha ocorrido somente após o nascimento dos animais PI, pois pode existir um período transitório entre a infecção aguda de alguns animais do rebanho e o nascimento de bezerros PI (HOUE, 1994).

Também reforça essa suposição a presença de animais que foram reagentes nas duas colheitas iniciais, porém apresentaram títulos de anticorpos até seis vezes

maior na 2ª colheita. Os demais animais de diferentes faixas etárias apresentaram altos títulos de anticorpos, os quais variaram de 160 a 10.240. Além disso, aquele animal que não havia sido reagente nas duas primeiras colheitas tornou-se reagente ao BVDV na 3ª colheita.

No período compreendido entre a 2ª e a 3ª colheitas realizadas no rebanho 4, foram vendidas algumas vacas e novilhas, assim como foram adquiridos outros animais. Logo após a 2ª colheita, foi inserido ao rebanho um lote de novilhos, e próximo à data da realização da 3ª colheita, também foram inseridas algumas novilhas. Nesse intervalo entre as colheitas, a bezerra PI foi a óbito, mas o outro bezerro PI permaneceu no rebanho.

Nos testes de VN realizados nas amostras provenientes da 3ª colheita, todos os novilhos que haviam sido inseridos ao rebanho foram reagentes ao BVDV, assim como permaneceram reagentes todos os bovinos que estavam no rebanho na ocasião da 2ª colheita, com exceção do animal PI. No entanto, do lote de novilhas recém-introduzido, duas novilhas foram reagentes ao vírus enquanto que nove não foram reagentes. O animal TI (Figura 3) detectado na 3ª colheita fazia parte desse grupo de animais não reagentes.

Coincidentemente, no dia da realização da 3ª colheita, o animal PI que já era um novilho e até então estava sendo mantido junto aos demais animais do rebanho, foi separado num outro lote com os outros novilhos existentes no rebanho, e esses animais foram transferidos para outra propriedade distante do local onde permaneceu o rebanho original.

A retirada da fonte de infecção do rebanho pôde ser verificada quando realizada a 4ª colheita. Das nove novilhas não reagentes ao BVDV na colheita anterior, somente quatro tornaram-se reagentes ao vírus, e dentre elas, a novilha que era TI. Como parte das novilhas permaneceu não reagente, a transmissão do vírus por meio do animal TI não foi tão eficiente (MOERMAN et al., 1993; LINDBERG & ALENIUS, 1999; SANDVIK, 2004; THURMOND, 2005).

Quando essas novilhas foram inseridas ao rebanho, algumas delas estavam com menos de 60 dias de gestação e outras ainda não estavam gestantes. Mesmo tendo

sido removido o animal PI, que é a principal fonte de infecção do BVDV (HOUE, 1995), algumas delas já tinham entrado em contato com o vírus, poderiam ter sofrido a infecção fetal e estariam gestantes de bezerros PI. Desse modo, os animais PI mantêm a infecção no rebanho (WITTUM et al., 2001).

Na análise do rebanho 17, em torno de 71% dos animais foram reagentes ao BVDV nos testes de VN nas duas primeiras colheitas (Tabela 18). A 3ª colheita, realizada apenas nos animais com até oito meses de idade, teve como objetivo a pesquisa de anticorpos nos animais sentinelas (PILLARS & GROOMS, 2002), dos quais nenhum foi reagente, com exceção daqueles que tinham menos de quatro meses de idade e possivelmente os anticorpos detectados eram de origem colostrar.

Na pesquisa do BVDV pela RT-PCR, o vírus não foi detectado em nenhuma das amostras de soro sanguíneo analisadas. Mediante os resultados encontrados, tanto na VN quanto na RT-PCR, esse rebanho estaria classificado no quarto estágio da infecção pelo BVDV segundo os parâmetros propostos por HOUE (1995), o qual correlaciona esse estágio à remoção recente dos animais PI do rebanho.

Antes da realização das colheitas pareadas, no momento em que foi feita a pesquisa da presença do BVDV no rebanho, segundo a metodologia proposta por PILLARS & GROOMS (2002), o proprietário informou que a ocorrência de alterações reprodutivas no rebanho tinha aumentado consideravelmente nos últimos meses, e que as novilhas eram o segmento mais comprometido. Essas informações sugeriram que o agente responsável pelos transtornos reprodutivos seria o BVDV, pois ao infectar rebanhos livres da enfermidade, as alterações reprodutivas são as primeiras consequências da infecção a serem notadas (SANDVIK, 2004).

A distribuição dos animais reagentes nas duas primeiras colheitas foi bastante homogênea entre as faixas etárias analisadas, porém com maior ocorrência nos animais adultos (Tabela 18). Os títulos de anticorpos apresentados nas amostras reagentes não foram tão altos quanto aqueles detectados nos demais rebanhos do estudo, sendo que o título máximo encontrado foi 640 (dados não mostrados). Esses resultados demonstraram que o BVDV disseminou-se por todo o rebanho, pois animais reagentes ao vírus foram detectados em todos os lotes.

Considerando a presença de animais reagentes em todo o rebanho, provavelmente a fonte de infecção seria um animal PI. No entanto, não deve ser descartada a hipótese da introdução do BVDV por animais TI, os quais também podem promover a permanência do vírus no rebanho (MOERMAN et al., 1993).

A área da propriedade destinada à criação do rebanho não era extensa e os lotes estavam localizados perto um dos outros. Como o regime de criação desse rebanho era semi-intensivo, os animais tinham acesso às pastagens e um desses lotes tinha contato com animais do rebanho vizinho, pois a separação entre eles era apenas por cerca. Esse contato seria um importante fator de risco na transmissão do BVDV (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

Apesar de ser um rebanho de exploração do tipo mista, pois se dedicava tanto à produção de leite quanto à produção de animais para o abate, não eram inseridos animais de outra procedência no rebanho. No sistema de produção utilizavam-se apenas os animais daquele plantel e a inseminação artificial para a reprodução. A comercialização restringia-se à venda de animais, ou de vacas em lactação ou de novilhos para o abate.

Os resultados encontrados tanto nos testes de VN realizados nas amostras de soro sangüíneo da 3ª colheita, como na RT-PCR realizada em 100 amostras provenientes das três colheitas, também forneceram evidências de que o BVDV não estava mais presente no rebanho. É importante mencionar que dentre os rebanhos analisados, o rebanho 17 foi o único que adotou uma medida para o controle da enfermidade: a vacinação contra o BVDV dos animais com idade superior a oito meses.

Vários fatores estariam associados à ausência do vírus no rebanho. Um deles seria com relação à maneira pela qual o vírus foi introduzido. Se tivesse sido por um animal TI, a infecção poderia ter cessado (MOERMAN et al., 1993), porém não foi estabelecida a infecção persistente. O BVDV para persistir num rebanho, independente da fonte de infecção, TI ou PI, tem que infectar algum animal gestante (LINDBERG & HOUE, 2005). Entretanto, apesar da existência de vacas e novilhas em diferentes estágios reprodutivos, animais PI não foram detectados no rebanho.

A vacinação dos animais também consiste num outro fator associado à ausência do BVDV. Logo após a 2ª colheita, uma vacina comercial inativada contendo o BVDV 1 e o BVDV 2 foi aplicada em quase todos os animais do rebanho, o reforço foi realizado após 30 dias, e a revacinação anual dos animais passou a fazer parte do programa sanitário do rebanho. Apesar de todas as limitações apresentadas pelas vacinas contra o BVDV, principalmente as vacinas inativadas (BOLIN, 1995; van OIRSCHOT et al., 1999; KELLING, 2004), essa hipótese deve ser considerada na prevenção da infecção fetal (BROCK, 2004; SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

Por outro lado, os bezerros machos não eram descartados após o nascimento e algumas vacas e bezerros eram mantidos juntos num lote, o que tornaria maior a probabilidade da ocorrência de animais PI no rebanho (LINDBERG & ALENIUS, 1999; GUNN et al., 2004). Além disso, a comercialização de animais era somente de vacas em lactação, portanto as novilhas permaneciam no rebanho. Como eram animais mais jovens, teoricamente teriam maior possibilidade de sofrer a infecção fetal, mas como o BVDV havia disseminado por todo rebanho, a imunidade adquirida enquanto jovem foi suficiente para a proteção da infecção fetal na idade reprodutiva (MUÑOZ-ZANZI et al., 2004).

É interessante notar a dinâmica variável da infecção pelo BVDV que existiu nos rebanhos analisados. Ao mesmo tempo em que as alterações reprodutivas eram muito evidentes no rebanho 17, a ocorrência do BVDV no rebanho 4 nem era suspeita, e no rebanho 1, as alterações sofridas eram moderadas e constantes, sugerindo que a infecção estaria presente no rebanho há um período considerável (SANDVIK, 2004).

Evidenciou-se também a importância dos fatores de risco na transmissão do BVDV, como a aquisição de animais de qualquer procedência pelo rebanho 4, assim como a provável hipótese da infecção do rebanho 17 ter originado a partir do rebanho vizinho. Outro importante fator de risco foi a existência do trânsito de animais entre rebanhos (DUBOVI, 1996), quer seja pela atuação de animais TI como fonte de infecção (TREMBLAY, 1996), ou pelo trânsito de animais PI e de vacas gestantes de bezerros PI.

O principal fator de risco associado com a introdução do BVDV num rebanho é a aquisição de vacas gestantes de fetos PI (BROCK, 2004). Possivelmente todos os três rebanhos monitorados contribuíram para a disseminação da enfermidade para outros rebanhos, pois todos comercializavam fêmeas gestantes. Talvez muitos dos rebanhos que receberam animais desses rebanhos monitorados adquiriram alguns “Cavalos de Tróia” (LINDBERG et al., 2002) e passaram a ter problemas após o nascimento dos bezerros PI (BROCK, 2004).

O rebanho 4 foi aquele que teve maiores possibilidades na disseminação do BVDV para outros rebanhos, pois apresentou aspectos extremamente favoráveis para tal: a detecção de animais PI demonstrou a presença da atividade viral; o constante trânsito dos animais representava a constante disponibilidade de animais susceptíveis à infecção; e a comercialização de animais de várias faixas etárias, desde bezerros até fêmeas gestantes, consistia na etapa conclusiva na transmissão do vírus.

6.7 CONCLUSÕES

- No monitoramento realizado em três rebanhos naturalmente infectados pelo BVDV, evidenciou-se, pelos resultados dos testes de VN e RT-PCR, que o vírus foi eliminado em dois deles, e no terceiro, a fonte de infecção ainda permaneceu no rebanho;
- A dinâmica da infecção pelo BVDV foi variável nos rebanhos analisados;
- O sistema de criação e o constante trânsito de animais no rebanho 4 foram favoráveis à permanência da infecção;
- A comercialização de animais pelos três rebanhos possivelmente contribuiu para a disseminação do BVDV para outros rebanhos.

6.8 REFERÊNCIAS

- ALVES, D.; TREMBLAY, R.; DODKIN, A.; ANDERSON, A. Update on bovine virus diarrhea in Ontario. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 37, n. 3, p. 177, 1996.
- BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 615-625, 1995.
- BROCK, K. V. The many faces of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2004.
- DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 9, p. 867-872, 1996.
- 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**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.
- GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B.; MOENING, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 113-115, 2003.
- GUNN, G. J.; STOTT, A. W.; HUMPHRY, R. W. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. **The Veterinary Journal**, London, v. 167, n. 2, p. 143-149, 2004.
- HOUE, H. Bovine virus diarrhea virus: detection of Danish dairy herds with persistently infected animals by means of a screening test of ten young stock. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 19, n. 3-4, p. 241-248, 1994.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 521-547, 1995.
- KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 115-129, 2004.
- KENNEDY, J. A. Diagnostic efficacy of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to screen cattle for persistent bovine viral diarrhea virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 229, n. 9, p. 1.472-1.474, 2006.
- KOZASA, T.; TAJIMA, M.; YASUTOMI, I.; SANO, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Relationship of bovine viral diarrhea virus persistent infection to incidence of diseases

on dairy farms base on bulk tank milk test by RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 41-47, 2005.

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

LINDBERG, A.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance control. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 55-73, 2005.

LINDBERG, A.; NISKANEN, R.; GUSTAFSSON, H.; BENGTSSON, B.; BAULE, C.; BELÁK, S.; ALENIUS, S. Prenatal diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection by detection of viral RNA in fetal fluids. **The Veterinary Journal**, London, v. 164, n. 2, p. 151-155, 2002.

MOEN, A. D.; SOL, J. A. N.; SAMPIMON, O. T. L. I. S. Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 93-98, 2005.

MOENNIG, V.; EICKEN, K.; FLEBBE, U.; FREY, H. R.; GRUMMER, B.; HAAS, L.; GREISER-WILKE, I.; LIESS, B. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 109-114, 2005.

MOERMAN, A.; STRAVER, P. J.; JONG, M. C. M.; QUAK, J.; BAANVINGER, T.; VAN OIRSCHOT, J. T. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. **The Veterinary Record**, London, v. 132, n. 25, p. 622-626, 1993.

MUÑOZ-ZANZI, C. A.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 6, p. 1085-1099, 2004.

OIE. Office International des Épizooties. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Paris. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00132.htm>. Acesso em: 30 ago. 2007.

PILLARS, R. B.; GROOMS, D. L. Serologic evaluation of five unvaccinated heifers to detect herds that have cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 499-505, 2002.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral

bovina na região sul do Rio Grande do Sul. **Semina**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

SANDVIK, T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhea virus in Europe. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 151-169, 2004.

SMITH, D.V.; GROTELUESCHEN, D. M. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 131-149, 2004.

SOLIS-CALDERON, J. J.; SEGURA-CORREA, V. M.; SEGURA-CORREA, J. C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, México: seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 253-262, 2005.

THURMOND, M. C. Virus transmission. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 5, p. 91-104.

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

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

WITTUM, T. E.; GROTELUESCHEN, D. M.; BROCK, K. V.; KVASNICKA, W. G.; FLOYD, J. G.; KELLING, C. L.; ODDE, K. G. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 83-94, 2001.

CAPÍTULO 7 - IMPLICAÇÕES

Diarréia viral bovina (BVD), vírus da diarréia viral bovina (BVDV), doença das mucosas (MD), animal persistentemente infectado (PI), animal transitoriamente infectado (TI), biótipo citopatogênico (CP), biótipo não citopatogênico (NCP), genótipos (BVDV 1 e BVDV 2), subgenótipos (BVDV 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j e 1k; BVDV 2a e 2b), são termos e abreviaturas que aumentam a complexidade dessa importante enfermidade dos bovinos.

O caráter subclínico da BVD, e conseqüentemente a ausência de sinais clínicos evidentes nos animais na maioria das infecções, contribuem ainda mais para que a enfermidade continue sendo considerada de pouca importância na bovinocultura brasileira. É claro que ultimamente muitas pesquisas sobre BVD estão sendo desenvolvidas no país, mas ainda é bem restrita a difusão da informação aos profissionais que lidam diretamente com os rebanhos bovinos.

A pouca importância, ou até mesmo o desconhecimento sobre a BVD, puderam ser sentidos nas atividades de prestação de serviços oferecidas pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – FCAV – UNESP – Jaboticabal/SP, onde foi realizado este trabalho. Das amostras de soro sanguíneo de animais provenientes de várias localidades do Estado de São Paulo e de outros Estados, encaminhadas para a realização de testes sorológicos de enfermidades que afetam a reprodução bovina, o diagnóstico para BVD sempre foi o menos solicitado. Algumas vezes foi considerado opcional, caso os demais testes tivessem apresentado resultado negativo.

A complexidade da enfermidade também se reflete na interpretação dos resultados. Existe o pré-conceito, não somente por parte dos proprietários, bem como de alguns médicos veterinários, de que a presença de anticorpos significa a existência do agente etiológico no animal. Por isso, quando recebem um resultado de exame para BVD, pensam até em dispor dos animais reagentes.

Em vários países, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, as pesquisas relacionadas à BVD são realizadas continuamente. O dinamismo da enfermidade faz com que cada vez mais novas informações sejam inseridas num vasto acervo e,

ultimamente, pesquisadores de todos os continentes também estão desenvolvendo pesquisas com o BVDV, principalmente aquelas direcionadas à caracterização filogenética das estirpes isoladas nos seus países.

A importância que a BVD representa para a produção bovina está demonstrada nas freqüentes publicações sobre a enfermidade, algumas vezes em volumes exclusivos editados por alguns periódicos. Além dessas publicações, no ano de 2005, foi publicado o livro “Bovine Viral Diarrhea Virus”, o qual reuniu vários pesquisadores que compilaram informações desde a primeira descrição da enfermidade até os dados das pesquisas desenvolvidas no período da publicação.

Nos países livres da febre aftosa, a BVD é considerada a enfermidade viral mais importante dos bovinos. Em alguns países da Comunidade Européia, a BVD tornou-se de notificação obrigatória e foram implantados programas de controle e erradicação da enfermidade. O primeiro programa sistemático para a erradicação do BVDV foi introduzido em 1993 na Suécia, seguido pela Dinamarca, Finlândia e Noruega. Inicialmente eram programas voluntários, mas posteriormente passaram a ser obrigatórios.

Os programas de controle e erradicação da BVD adotados na Comunidade Européia utilizam dois diferentes parâmetros. Um deles é o esquema adotado pela Suécia e por países com baixa densidade populacional bovina, em que não é empregada a vacinação. No entanto, em outros países como a Alemanha, o programa de controle e erradicação emprega a vacinação de forma sistemática, devido principalmente à alta densidade populacional.

Os principais objetivos desses programas consistem no teste inicial para a verificação do estágio de infecção da enfermidade, seguido pelo diagnóstico individual de animais infectados, e após a remoção da fonte de infecção, é realizado o monitoramento dos rebanhos associado a medidas de biossegurança. Naqueles países em que o controle da BVD é feito sem o emprego de vacinas, o monitoramento é realizado pela pesquisa de anticorpos e do vírus em amostras individuais de soro sanguíneo ou em “pool”, e no caso de rebanhos leiteiros, a pesquisa também é feita em amostras de leite de conjunto.

O objetivo desta pesquisa foi fruto da percepção de um médico veterinário de campo, que dentre as dificuldades que permearam a sua atuação profissional, lidava com o descaso em que a maioria dos pecuaristas tinha com a sanidade animal; com o baixo retorno econômico obtido no setor pecuário, que sempre foi um entrave para qualquer melhoria na sanidade do rebanho; com as distâncias dos centros que disponibilizavam exames diagnósticos; e também com as distâncias que impossibilitavam as oportunidades de contatos e de atualização profissional.

No conjunto dessas percepções, o trabalho teve um direcionamento comum: a aplicabilidade prática. De que maneira a pesquisa poderia contribuir para este segmento de médicos veterinários, no sentido de convencer o proprietário a realizar um exame diagnóstico nos animais de seu rebanho, de forma mais simples e menos onerosa, e que também fornecesse dados passíveis de interpretação correta. Foi com esse princípio que o trabalho foi delineado a partir da utilização de poucas amostras de animais por rebanho, as quais seriam suficientes para demonstrar a presença da infecção.

Além desse propósito, este trabalho também demonstrou a ocorrência da infecção pelo BVDV em qualquer tipo de rebanho bovino, assim como animais PI podem estar presentes nos rebanhos e não apresentar nenhuma característica que os identifique; mostrou que as estirpes isoladas do BVDV participam da diversidade genética encontrada por todo mundo, e que a utilização das vacinas nos rebanhos brasileiros deve atentar a essa diversidade; os testes sorológicos realizados indicaram as diferenças antigênicas existentes entre o BVDV 1 e o BVDV 2, mas sugeriram a hipótese da determinação do limiar que essas diferenças comprometeriam o diagnóstico de rebanhos verdadeiramente infectados; e também foi possível demonstrar a dinâmica da infecção em diferentes rebanhos, a possibilidade da eliminação espontânea do vírus e as condições que muitos rebanhos bovinos nacionais favorecem para a permanência e a disseminação do BVDV.

Enfim, BVD é um tema interessante, surpreendente, intrigante, peculiar...