

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA
O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM SUÍNOS**

Igor Renan Honorato Gatto

Medico Veterinário

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA
O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM SUÍNOS**

Igor Renan Honorato Gatto

Orientador: Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

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

2015

G918p Gatto, Igor Renan Honorato
Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em
suínos / Igor Renan Honorato Gatto. -- Jaboticabal, 2015
xix, 76 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Luís Guilherme de Oliveira

Banca examinadora: Hélio José Montassier, Edviges Maristela
Pituco

Bibliografia

1. *Pestivirus*. 2. Matadouros-frigoríficos. 3. Fatores de risco. 4.
Virusneutralização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:578.7:636.4

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM SUÍNOS

AUTOR: IGOR RENAN HONORATO GATTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUÍS GUILHERME DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUÍS GUILHERME DE OLIVEIRA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. EDVIGES MARISTELA PITUCO

Instituto Biológico / São Paulo/SP

Data da realização: 26 de fevereiro de 2015.

Dados Curriculares do Autor

Igor Renan Honorato Gatto – Filho de Edvaldo Lázaro Gatto e Rosângela Honorato Gatto, nascido em 27 de dezembro de 1989, em Jales/SP, é Médico Veterinário, formado em janeiro de 2013, pela Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO) Câmpus Fernandópolis, São Paulo. Realizou duas iniciações científicas com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – UNICASTELO de 2010 a 2012. Realizou estágio curricular no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo. Iniciou o curso de Pós-graduação Stricto Senso, Mestrado em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, em março de 2013.

"O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos."

Paulo Coelho

Dedico

Aos meus pais, Edvaldo Lázaro Gatto e Rosângela Honorato Gatto, pelos conselhos, a pressão crítica e o incentivo aos meus estudos, e para meus avôs, Severino Gatto e Manoel Luiz da Silva (*in memoriam*), por serem a base do sonho.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, agradeço a todos que me deram a força necessária para que eu pudesse atingir meus objetivos.

Aos meus pais, *Edvaldo Lázaro Gatto e Rosângela Honorato Gatto e a Deus*. Por todos os conselhos, a pressão crítica e o incentivo aos meus estudos. A liberdade de escolha, a imparcialidade quanto às minhas decisões. As recomendações e o direcionamento para o futuro. A busca da felicidade completa. A benção da inteligência e da saúde.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelos amigos que conheci e que ficarão para o resto da vida marcados na história. Em especial a técnica Andrea Souza Ramos de Medeiros e meu coorientador Samir Issa Samara, pelas horas dedicadas aos ensinamentos técnicos, cobranças pessoais, crescimento intelectual e pessoal.

Aos meus amigos da República Antro do HV, por me acolherem e se tornarem sem restrição como minha segunda família, irmãos, não de sangue, mas eternos.

À minha namorada, Priscila Silva, por fazer parte da minha trajetória e apoiar minhas escolhas.

Ao meu orientador, Luis Guilherme de Oliveira, por depositar confiança e acreditar no meu potencial, deixando começar sua carreira acadêmica como primeiro orientado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Dedico esta pesquisa com a certeza de estar semeando o conhecimento e a busca de horizontes cheios de esperança.

SUMÁRIO

| Assunto | Página |
|---|---------------|
| RESUMO..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| LISTA DE TABELAS..... | vi |
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 03 |
| 2.1 Considerações sobre o agente etiológico..... | 03 |
| 2.2 Epidemiologia..... | 05 |
| 2.2.1 Estudos de prevalência..... | 06 |
| 2.2.2 Fatores de risco..... | 07 |
| 2.2.3 Relação entre o CSFV e o BVDV..... | 07 |
| 2.3 Sinais Clínicos observados nas diferentes espécies..... | 08 |
| 2.4 Técnicas diagnósticas..... | 10 |
| 3. OBJETIVOS..... | 11 |
| 3. 1 Objetivos Gerais..... | 11 |
| 3. 2 Objetivos Específico..... | 11 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| 4. 1 Seleção das amostras..... | 12 |
| 4. 2 Amostragem..... | 14 |
| 4. 3 Método de colheita..... | 19 |
| 4. 4 Teste de virusneutralização (VN)..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 4.4.1 Manutenção das culturas celulares..... | 20 |
| 4.4.2 Multiplicação do vírus padrão..... | 21 |
| 4.4.3 Titulação viral..... | 22 |
| 4.4.4 Pesquisa de anticorpos neutralizantes..... | 22 |
| 4.4.5 Controle da TCID ₅₀ para 100 TCID..... | 24 |
| 4.4.6 Controle da TCID ₅₀ para 50 TCID..... | 25 |
| 4.5 Diagnóstico diferencial de peste suína clássica(PSC)..... | 25 |
| 4.6 Aplicação do questionário..... | 26 |
| 4.7 Análise estatística..... | 26 |
| 5. RESULTADOS | 28 |
| 5.1 Teste de VN para BVDV-1..... | 28 |
| 5.2 Teste de VN para BVDV-2..... | 30 |
| 5.3 Análise dos resultados sorológicos para os genótipos 1 e 2 de BVDV..... | 33 |
| 5.4 Reação cruzada entre BVDV-1 e 2..... | 35 |
| 5.5 Prevalência de BVDV conforme os estados de origem dos animais..... | 36 |
| 5.6 Resultados dos títulos encontrados..... | 39 |
| 5.7 Comparação dos títulos de anticorpos obtidos na VN frente a 100 TCID ₅₀ ou 50 TCID ₅₀ | 43 |
| 5.8 Análise dos fatores de risco..... | 45 |
| 5.8.1 BVDV-1..... | 45 |
| 5.8.2 BVDV-2..... | 47 |
| 5.9 Efeito citopático do BVDV-1 (estipe Singer) e do BVDV-2 (estirpe VS 253)..... | 50 |
| 6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PESTE SUÍNA CLÁSSICA (PSC)..... | 52 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 55 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 63 |

| | |
|------------------|----|
| REFERÊNCIAS..... | 64 |
| Anexo I | 75 |
| Anexo II..... | 76 |

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM SUÍNOS

RESUMO- Os suínos são susceptíveis a infecção por diversas espécies de *Pestivirus*, a infecção de suínos com pestivírus de ruminantes tem gerado preocupação em diversos países, dependendo do método utilizado, o diagnóstico entre BVDV e CSFV pode ser dificultado. O presente trabalho teve como objetivo verificar a prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em suínos terminados. Para tal, foram investigadas as prevalências do BVDV-1 e 2, obtiveram-se informações de prevalência de acordo com a origem das amostras, foram associados fatores de risco à ocorrência da infecção, verificado as diferenças entre os títulos das amostras positivas testadas com 100 TCID₅₀ e 50 TCID₅₀ e realizado diagnóstico diferencial para PSC. Os soros sanguíneos foram obtidos de suínos enviados para matadouros-frigoríficos no estado de São Paulo. As propriedades de origem dos suínos eram localizadas nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As amostras foram submetidas ao teste de VN conforme preconizado pelo “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” (OIE), para as sororreagentes, foi realizado o diagnóstico diferencial para PSC pelo método de ELISA. Foram analisadas 1705 amostras de soro sanguíneo de suínos, obtidas de 33 propriedades. O teste de VN indicou 5,34% (91/1705) de amostras sororreagentes ao BVDV, sendo 3,0% (51/1705) para o genótipo 1 e 2,35% (40/1705) para o genótipo 2. Considerando a origem das amostras, destacam-se os estados do Mato Grosso, com 10,00% e Rio Grande do Sul, com 9,18% de amostras sororreagentes ao BVDV-1, contra o BVDV-2, destacam-se os estados do Mato Grosso, com 6,0% e Mato Grosso do Sul, com 4,29% de sororreagentes. Nenhum fator de risco teve associação significativa com a ocorrência de infecção ao BVDV-1, contudo, para o BVDV-2, foram encontradas associações significativas nos fatores: “caminhões não são lavados e desinfetados” e “visitantes não respeitam vazio sanitário de 72 horas” ($p < 0,05$). As GMT dos títulos contra o BVDV-1 foram maiores quando testadas com 100 TCID₅₀, contudo, as GMT dos títulos contra o BVDV-2 foram maiores quando testadas com 50 TCID₅₀. Nenhuma amostra sororreagente ao BVDV foi positiva para anticorpos específicos contra PSC. Fica evidenciado que a infecção de suínos com pestivírus de ruminantes ocorre no Brasil, ressaltando que a biossegurança é fundamental para minimizar a interação de agentes interespecíficos.

Palavras-chave: *Pestivirus*, matadouros-frigoríficos, fatores de risco, virusneutralização

PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST THE BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN PIGS

ABSTRACT - Several species of *Pestivirus* have pigs as susceptible hosts. The infection of ruminant pestivirus in pigs have been concerning many countries and depending on the diagnosis test used it is hard to differ BVDV from CSFV infections due to serological cross-reaction in diagnostic tests. This study aimed on determining the prevalence of antibodies against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in finisher pigs. Prevalence of BVDV -1 and BVDV-2 was investigated and information about the samples origin were analyzed in order to associate the the occurrence of the infection with possible risk factors. The samples were tested using 100 TCID₅₀ and 50 TCID₅₀ and the differences between the titers were analyzed. In addition, differential diagnosis for Classical Swine Fever (CSF) was done in all positive samples. The blood sera samples were obtained from pigs sent to slaughterhouses in the state of São Paulo. The origin of the animals was from farms located in the states of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goias, Sao Paulo, Parana, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The samples were tested using the virus neutralization (VN) test according to the "Manual of Diagnostic Tests Vaccines for Terrestrial Animals" (OIE) and the positive samples were ELISA tested to differ from CSF. 1705 swine serum samples from 33 farms were tested. The VN test showed 5.34% (91 / 1705) of seropositive samples for BVDV, with 3.0% (51 / 1705) for genotype 1 and 2.35% (40 / 1705) for genotype 2. Considering the origin of the samples, the highlights are the states of Mato Grosso, with 10.00% and Rio Grande do Sul, with 9.18% of seropositive for BVDV-1. Regarding to BVDV-2, states that had the highest number of positive samples were Mato Grosso (6.0%) and Mato Grosso do Sul, (4.29%). No significant association was found between risk factors the occurrence of BVDV-1 infection, however, for BVDV-2 positive cases significant associations were found with the risk factors "trucks are not washed and disinfected" and "visitors do not respect empty toilet 72 hours "(p <0.05). GMT of BVDV-1 titters were higher when tested using 100 TCID₅₀, however, the GMT of the BVDV-2 titers were higher when tested at 50 TCID₅₀. No positive BVDV samples were positive when tested for specific antibodies against CSF. It is evident that infection of pigs with ruminant pestivirus occurs in Brazil, showing that biosecurity is essential to minimize the transmission of interspecies agents.

Keywords: *Pestivirus*, slaughterhouse, risk factors, virus neutralization

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Número de amostras de soro sanguíneo, coletadas em matadouros-frigorífico no estado de São Paulo, das diferentes propriedades no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 15 |
| Tabela 2 | Municípios e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de virusneutralização para BVDV-1 (estirpe Singer), de um total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 29 |
| Tabela 3 | Municípios e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de virusneutralização para BVDV-2 (estirpe VS 253), de um total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 31 |
| Tabela 4 | Comparação das reações de VN ao BVDV-1 e ao BVDV-2 realizadas em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 35 |
| Tabela 5 | Frequência (%) e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes ao BVDV-1 (Singer) pelo teste de virusneutralização de acordo com estado de origem, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 36 |
| Tabela 6 | Frequência (%) e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes ao BVDV-2 (VS 253) pelo teste de virusneutralização de acordo com estado de origem, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 38 |
| Tabela 7 | Número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes e as variações dos títulos de anticorpos no teste de VN contra o BVDV-1 (Singer), em amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 40 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 8 | Número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, e a variação dos títulos de anticorpos no teste de VN contra o BVDV-2 (VS 253), em amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 42 |
| Tabela 9 | Análise univariada dos fatores de risco para a presença de anticorpos contra BVDV-1, no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 46 |
| Tabela 10 | Resultado da análise de regressão logística multivariada obtida com modelo incluindo as variáveis associadas com a infecção (com $p < 0,2$ na análise univariada) por BVDV-1 (Singer) em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 47 |
| Tabela 11 | Análise univariada dos fatores de risco para a presença de anticorpos contra BVDV-2, no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 48 |
| Tabela 12 | Resultado da análise de regressão logística univariada obtida com modelo incluindo as variáveis associadas com a infecção (com $p < 0,2$ na análise univariada) por BVDV-2 (VS 253) em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 49 |
| Tabela 13 | Resultado da análise de regressão logística multivariada obtida com modelo incluindo as variáveis associadas com a infecção (com $p < 0,2$ na análise de regressão logística univariada) por BVDV-2 (VS 253) em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14..... | 49 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 14 | Porcentagem de inibição obtida no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o vírus da PSC, em amostras sororreagentes no teste de virusneutralização para anticorpos contra BVDV-1 (Singer), em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 52 |
| Tabela 15 | Porcentagem de inibição obtidas no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o vírus da PSC, em amostras sororreagentes no teste de virusneutralização para anticorpos contra BVDV-2 (VS 253), em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Mapa com a localização geográfica dos municípios do estado do Mato Grosso (A) e estado do Mato Grosso do Sul (B), da região Centro-oeste, Brasil, onde foram coletadas as amostras no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14 | 16 |
| Figura 2 | Mapa com a localização geográfica dos municípios do estado de Goiás (C) e estado do Rio Grande do Sul (D), da região Centro-oeste e Sul, Brasil, onde foram coletadas as amostras no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14 | 17 |
| Figura 3 | Mapa com a localização geográfica dos municípios do estado do Paraná (E) e estado de Santa Catarina (F), da região Sul, Brasil, onde foram coletadas as amostras no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14 | 18 |
| Figura 4 | Mapa do estado de São Paulo destacando o município onde está localizada a propriedade com amostras coletadas, no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 19 |
| Figura 5 | Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de virusneutralização, para detecção de anticorpos anti-BVDV-1 (Singer), em relação ao total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 28 |
| Figura 6 | Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de virusneutralização, para detecção de anticorpos anti-BVDV-2 (VS 253), em relação ao total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 31 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 7 | Representação gráfica da porcentagem de propriedades com amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de VN, contra a estirpe de BVDV-1 (Singer) e contra a estirpe BVDV-2 (VS 253), em relação ao total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 34 |
| Figura 8 | Representação gráfica da porcentagem de propriedades com amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de VN, contra a estirpe de BVDV-1 (Singer) e contra a estirpe BVDV-2(VS 253), em relação ao total das 33 propriedades coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 35 |
| Figura 9 | Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de VN para detecção de anticorpos anti-BVDV-1 (Singer), de acordo com os estados de origem das 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 37 |
| Figura 10 | Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de VN para detecção de anticorpos anti-BVDV-2 (VS 253), de acordo com os estados de origem das 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 39 |
| Figura 11 | Representação gráfica da variação das médias geométricas dos títulos contra BVDV-1 (Singer) encontrados em 51 amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, quando submetidos ao teste de VN com 100 TCID ₅₀ e 50 TCID ₅₀ , em relação ao total des 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 43 |
| Figura 12 | Representação gráfica da variação das médias geométricas dos títulos contra BVDV-2 (VS 253) encontrados em 40 amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, quando submetidos ao teste de VN com 100 TCID ₅₀ e 50 TCID ₅₀ , em relação ao total des 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14..... | 44 |

- Figura 13** Foto de micrografia eletrônica do efeito citopático do BVDV-1 (estirpe Singer) em células MDBK. A: Controle negativo (aumento 40x) tapete celular íntegro. B: Sem efeito citopático. Neutralização positiva para BVDV-1 (aumento 40x). C e D: Efeito citopático (aumento 40x)..... 50
- Figura 14** Foto de micrografia eletrônica do efeito citopático do BVDV-2 (estirpe VS 253) em células MDBK. A: Sem efeito citopático. Neutralização positiva para BVDV-2 (aumento 40x). B: Efeito citopático (aumento 40x)..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS

BD: Doença das Fronteiras

BDV: vírus da doença da fronteira de ovinos

BVDV: vírus da diarreia viral bovina

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

C: proteína de capsídeo

cp: citopático

CO₂: gás carbônico

CSA: camelídeos sul-americanos

CVM: camelídeos do velho mundo

DO: densidade ótica

E: glicoproteína de envelope

ECP: efeito citopático

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

EUA: Estados Unidos da América

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

G: giros

GMT: média geométrica

GO: Goiás

°C: graus Celsius

GTA: guia de trânsito animal

IB: Instituto Biológico

IC: intervalo de confiança

IV: isolamento viral

MDBK: Madin Darby Bovine Kidney

MEM: minimum essential medium

mL: mililitro

MS: Mato Grosso do Sul

MT: Mato Grosso
N^{pro}: Autoprotease
n_{cp}: não citopático
nm: nanômetro
NS: não estrutural
OIE: Organização Internacional de Saúde Animal
OR: odds ratio
p: Teste exato de Fisher
P: prevalência
pi: porcentagem de inibição
PI: persistentemente infectado
PR: Paraná
PSC: peste suína clássica
%: porcentagem
RR: risco relativo
RS: Rio Grande do Sul
RT-PCR: transcrição reversa combinada à reação em cadeia pela polimerase
SFB: soro fetal bovino
SC: Santa Catarina
SISP: Serviço de Inspeção Estadual
SIF: Serviço de Inspeção Federal
SP: São Paulo
TCID: dose infectante por cultura de tecido
µl: micrograma
µl: microlitro
Unesp: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VN: virusneutralização
X²: Teste de Qui-quadrado

1. INTRODUÇÃO

Os vírus do gênero *Pestivirus* que infectam os suínos são o vírus da peste suína clássica (CSFV), o vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2), o vírus da doença da fronteira de ovinos (BDV) e o Bungowannah. Estes dois últimos são considerados exóticos no Brasil.

Para os países com produção intensiva de proteína animal e que têm cada vez mais a necessidade de exportar, como é o caso do Brasil, devem se priorizar os programas de erradicação das enfermidades de notificação obrigatória e cumprir as exigências da OIE. A peste suína clássica é o principal alvo de trabalho para as autoridades sanitárias brasileiras. Portanto, o sistema de vigilância nas áreas livres, o reconhecimento internacional de área livre de e a erradicação em áreas ainda consideradas endêmicas e/ou com *status* desconhecido torna-se trabalho fundamental para o amplo desenvolvimento e consolidação da suinocultura brasileira no mercado mundial.

Nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, o reconhecimento de área livre para CSFV é pioneiro no Brasil, a região Sul iniciou esse trabalho pelo já cumprimento das exigências preconizadas pela OIE. Os outros estados brasileiros devem adequar-se às exigências da OIE, para a requisição do reconhecimento como livre da infecção. As falhas de monitoramentos adequados em áreas endêmicas no Brasil, a extensão geográfica, a presença de suínos selvagens e/ou asselvajados e a irrelevância comercial de algumas regiões, dificultam um plano de contingência maciço e efetivo no controle da peste suína clássica (PSC).

As pesquisas são concludentes sobre a capacidade de o BVDV infectar suínos e outras espécies. Por se tratar do mesmo gênero, já foi comprovado que existem reações sorológicas cruzadas entre o BVDV e o CSFV, e esse possível equívoco no diagnóstico tem despertado cada vez mais a preocupação, pois se procura obter maior acurácia nos inquéritos sorológicos realizados nos programas de vigilância e erradicação para da PSC.

A despeito dos problemas diagnósticos, tem-se dado atenção às infecções causadas pelo BVDV em suínos pelo fato da patogenicidade em fêmeas gestantes apresentar alguns sinais clínicos semelhantes à PSC. A infecção intrauterina pelo

BVDV pode levar a falhas reprodutivas semelhantes às produzidas por amostras de vírus da PSC de patogenicidade baixa ou média. Assim, há possibilidade de confusões no processo de vigilância para PSC, pois pode haver indícios clínicos que serão embasados na notificação de uma suspeita de foco.

A relação entre os pestivírus, principalmente entre o BVDV e o CSFV, e a possibilidade de infecção de suínos pelo BVDV, levanta a questão se os métodos laboratoriais empregados no controle do CSFV são criteriosos o suficiente para diferenciar esses dois agentes etiológicos. A reação cruzada entre o BVDV e o CSFV pode ser um entrave para o correto diagnóstico. Consequentemente, as informações sobre a ocorrência ou prevalência da infecção do BVDV em suínos no Brasil são inexistentes. Torna-se importante pesquisar e diferenciar a ocorrência do BVDV nas diferentes formas de criação e analisar quais são os fatores de risco mais relevantes em cada situação.

Tendo em vista os prejuízos econômicos que a infecção de suínos pelo BVDV pode causar, a falta de dados sobre a ocorrência e prevalência da enfermidade no Brasil, a grande importância que as reações cruzadas entre BVDV e o CSFV apresentam, o fato de essa infecção ser desconhecida pelos suinocultores, a não existência de estudos sobre fatores de risco associados à infecção, trabalhos são necessários visando a fornecer maiores informações sobre a situação atual do rebanho suíno e conhecimento sobre a epidemiologia para a eventual elaboração de programas de prevenção, controle ou mesmo erradicação.

Portanto, tomou-se como hipótese que o BVDV apresenta baixa ocorrência em suínos provenientes de granjas comerciais e enviados ao abate em matadouros-frigorífico, fato esse, justificado pela ausência de fatores de risco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nos sistemas de produção de suínos, bovinos e ovinos, podem-se citar as infecções virais causadas por agentes do gênero *Pestivirus*. Atualmente são reconhecidas 4 espécies deste gênero que podem infectar os suínos, o vírus da peste suína clássica (CSFV), o da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2), o da doença da fronteira de ovinos (BDV) (BECHER et al., 2003), e recentemente foi isolado o vírus Bungowannah (KIRKLAND et al., 2007) a partir da constatação de suínos com miocardite (FINLAISON et al., 2009). Não se tem relato ainda se o “Hobiblike” (ou BVDV-3) afeta os suínos (SCHIRRMEIER et al., 2004; STÄHL et al., 2007).

No Brasil, o BVDV encontra-se amplamente disseminado pelos rebanhos de bovinos, especializados para produção de leite ou de carne (QUINCOZES et al., 2007). Esses isolados foram identificados e caracterizados geneticamente como pertencentes aos genótipos 1 e 2 (FLORES et al., 2005; CORTEZ et al., 2006, LUNARDI et al., 2008). É o contrário do que se observa em suínos sobre os quais não existem dados sobre a prevalência do BVDV no Brasil, somente alguns estudos de reação cruzada entre BVDV e CSFV (MOSER, 2011).

2.1 Considerações sobre o agente etiológico

Os membros do gênero *Pestivirus* possuem vírions pequenos (40 a 60 nm de diâmetro) com um nucleocapsídeo icosaédrico envolto em envelope lipídico (RIDPATH; FLORES, 2007). Possui como material genético uma fita única de RNA, que está constantemente sofrendo mutações e recombinações genéticas (BAUERMANN et al., 2013).

A estrutura dos pestivírus é composta por quatro proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C) e três glicoproteínas inseridas no envelope (E^{ms} , E1, e E2) (THIEL et al., 2005). As proteínas E1 e E2, encontradas na membrana viral, são necessárias para a infectividade dos vírions. A E2 é alvo para grande parte dos anticorpos neutralizantes (RONECKER et al., 2008). Assim como algumas proteínas não estruturais, destaque para a N^{pro} só encontrada nos pestivírus, sendo a região de eleição para comparação inicial de isolados (RIDPATH; FLORES, 2007) e a

segunda proteína não estrutural é a NS2/3, presente em cepas não-citopáticas (ncp). NS3 representa a parte C-terminal da NS2, porém em células infectadas com vírus citopáticos (cp), ocorre à expressão de NS3 (gerando NS2 e NS3) devido a mutações na NS2 (KÜMMERER; MEYERS, 2000).

Existem dois biótipos conhecidos de pestivírus: os cp e os ncp. Os ncp são mais comumente encontrados no campo e capazes de produzir infecção persistente em fetos. No caso do BVDV, essas infecções persistentes ocorrem em fetos infectados entre 40 e 120 dias de prenhez. Já os cp são considerados uma mutação do biótipo ncp e, por isso, são menos comuns na natureza (FLORES; RIDPATH, 2007).

No mundo têm sido realizadas descrições de pestivírus atípicos, como o *Giraffe*, isolado de girafa no Kenya (BECHER et al., 2003), *Pronghorn vírus*, isolado de antílope nos EUA (VILCEK et al., 2005), *Bungowannah vírus*, isolado de suíno na Austrália (KIRKLAND et al., 2007), e o *Hobi-like virus*, identificado em várias partes do mundo e também no Brasil (SCHIRRMIER et al., 2004, CORTEZ et al., 2006).

Na China, foram reconhecidas dois genótipos do BVDV-1, em duas estirpes não citopáticas isoladas de suínos, ZM - 95 (XU et al., 2006) e SD0806 (DENG et al., 2012a), e um outro genótipo de uma estirpe não citopática referente ao genótipo 2, a SH - 28, também isolada de um suíno (TAO et al., 2013b).

O BVDV tem como hospedeiro natural os bovinos, porém tem uma alta capacidade de infectar outros ruminantes domésticos e silvestres (FLORES, RIDPATH, 2007). Os pestivírus ainda são evidenciados em cervos, búfalos, girafas e javalis (ZAGHAWA, 1998; NETTLETON, 1990), em antilocabras (FROLICH et al., 2005), camélídeos sul-americanos (CSA) e camélídeos do velho mundo (CVM), que apresentam certa resistência aos sinais clínicos (VAN AMSTEL; KENNEDY, 2010). Estudos esporádicos confirmaram a presença de infecção ao BVDV em suínos (DARBYSHIRE, 1961; STEWART et al., 1971; FERNELIUS et al., 1973; CARBREY et al., 1976; TERPSTRA; WENSVOORT, 1988; LIESS; MOENNING, 1990; ROEHE, 1998; RIDPATH, 2010)

Infecções persistentes podem ser observadas em pelo menos outras oito espécies, como ovelhas, cabras, alpacas, veados-de-cauda-branca, alce, rato, cabra-americana-da-montanha e suínos (BACHOFEN et al., 2013).

2.2 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos colocam os bovinos como os principais hospedeiros do BVDV, e a principal fonte de infecção para os suínos e outros ruminantes selvagens (VANNIER; ALBINA, 1999; RIDPATH, 2010). A transmissão também pode ocorrer devido ao uso de leite de bovinos infectados e outros derivados na alimentação de suínos (TERPSTRA; WENSVOORT, 1988) e por meio de fômites (CARBREY et al., 1976). Ao contrário do que se acreditava antes, um modelo de infecção experimental demonstrou que a transmissão também ocorre entre os suínos, porém de forma limitada; assim, o vírus pode desaparecer de uma população se não ocorrerem novas introduções (WIERINGA-JELSMA et al., 2006). Deng et al. (2012b) afirmam que a prevalência do BVDV em rebanhos suínos está intimamente ligada à prevalência da enfermidade em rebanhos bovinos.

O BVDV está inserido num grupo peculiar de vírus que causa infecções em ruminantes domésticos. Países com pecuária bovina altamente explorada sofrem com as grandes perdas promovidas pelo BVDV (GREISER-WILKE et al., 2003).

Foram descritos alguns fatores de risco que podem estar associados à ocorrência de BVDV em suínos, como a presença de gado na mesma fazenda, alta densidade de pequenos ruminantes próximos ao rebanho, vacinas contaminadas com BVDV, e a idade do animal (LENIHAN; COLLERY, 1977; VANNIER et al., 1988; LIESS; MOENNIG, 1990; LOEFFEN et al., 2009).

A presença de anticorpos contra BVDV em suínos pode prevenir a transmissão de CSFV (WIERINGA-JELSMA; QUAK; LOEFFEN, 2006). Isso é possível pela relação antigênica entre os pestivírus e a reatividade sorológica cruzada. Os títulos de anticorpos são médios a altos, quando a espécie de pestivírus é homóloga e baixos a outros pestivírus (RIDPATH; FLORES, 2007). Porém, em estudo com suínos previamente infectados com BVDV e desafiados com CSFV, os títulos foram maiores contra o BVDV do que contra CSFV, podendo resultar em um teste falso-negativo para CSFV (DENG et al., 2014).

Portanto, os pestivírus de ruminantes que infectam os suínos são de extrema importância na suinocultura, pois além de infectar seus hospedeiros usuais, podem

infectar os suínos, e manifestar sinais clínicos e interferir com o diagnóstico laboratorial da PSC (WIERINGAJELSMA; QUAK; LOEFFEN, 2006).

2.2.1 Estudos de prevalência

Na busca por informações sobre infecção pelo BVDV em suínos, os primeiros inquéritos sorológicos foram realizados na década de 1960. Naquela época, na Austrália, Snowdon e French (1968) suspeitaram que suínos pudessem estar infectados por BVDV, porém sem que tivesse ocorrido relato da infecção natural, suspeita comprovada posteriormente pelo isolamento do vírus de suínos a partir de uma infecção natural (FERNELIUS et al., 1973).

Loeffen et al. (2009) determinaram uma soroprevalência de anticorpos contra BVDV-1 estimada de 0,42% nos suínos de terminação, e encontraram animais sororreagentes em 3,2% dos rebanhos. Já para fêmeas em idade reprodutiva, a prevalência foi 2,5%, com 11% dos rebanhos infectados.

Em estudo realizado na China entre 2007 e 2010, amostras coletadas de suínos com sinais clínicos de hiperpirexia, morte de leitões, diarreia e abortamento foram submetidas à busca por amplificação de material genético. Os resultados demonstraram uma prevalência de 23,1% em 2007; 27,7% em 2008; 33,6% em 2009 e 23,6% em 2010, mostrando uma alta prevalência da infecção por BVDV-1 (DENG et al., 2012b).

Em outros países, as pesquisas em suínos mostram ocorrências entre 3% e 40% na Áustria e na Alemanha, e de 15% a 20% na Holanda (LIESS; MOENNING, 1990; O'CONNOR et al., 1991; TERPSTRA; WENSVOORT, 1991). Na Noruega, foi determinada soroprevalência de BVDV-1 (estirpe NADL) de 2,2% (LOKEN et al., 1991). Na Irlanda, um inquérito epidemiológico demonstrou que apenas uma amostra de 660 em estudo comparativo apresentou títulos quatro vezes maior para BVDV-1 do que para a Doença das Fronteiras (BD) (GRAHAM et al., 2001). Já na Dinamarca, a soroprevalência em suínos domésticos foi de 6,4% para BVDV-1 (estirpe Ug59) (HOLM JENSEN, 1985).

Contudo, em estudo realizado com rebanho-sentinela de suínos no estado de Ontario, Canadá, não foi identificado animal algum positivo para BVDV (O'SULLIVAN et al., 2011).

2.2.2 Fatores de risco

De acordo com vários autores, diferentes práticas utilizadas ou empregadas na bovinocultura podem influenciar na introdução e/ou manutenção da infecção pelo BVDV nos rebanhos bovinos (MAINAR-JAIME et al., 2001; QUINCOZES et al., 2007; LUZZAGO et al., 2008; TALAFHA et al., 2008).

Estudos realizados identificaram como possíveis fatores de risco à infecção do BVDV, o tamanho do rebanho/propriedade; confinamento, utilização de pastos em comum; aluguel de pasto; contato de bovinos com outras espécies animais, domésticas ou silvestres; comércio de animais; participação em eventos, como feiras, exposições, torneios e baixa biosseguridade (CELEDÓN et al., 2001; MAINAR-JAIME et al., 2001; VAN SCHAİK et al., 2001; BROCK, 2003; POLETTO et al., 2004; LUZZAGO et al., 2008; TALAFHA et al., 2008).

Ainda, segundo Chaves et al. (2012), um estudo realizado no estado do Maranhão identificou como possível fator de risco associado à infecção de bovinos leiteiros não vacinados, a presença de suínos na mesma propriedade.

2.2.3 Relação entre o CSFV e o BVDV

O CSFV se encontra estreitamente relacionado, antigenicamente, assim como geneticamente, com outros dois vírus desse gênero, o BVDV e o BDV. Os dois últimos vírus podem infectar os suínos, mesmo tendo os ruminantes como os hospedeiros primários e ambos podem causar sinais clínicos similares aos da peste suína clássica (ARIAS et al., 2003).

Wieringa-Jelsma et al. (2006) confirmaram que suínos infectados pelo BVDV apresentam resistência à infecção por CSFV, não se detectando, também, a transmissão deste último entre os animais do rebanho.

Problema que agrava esta relação, cada vez mais a contaminação de soro fetal utilizados em cultivos celulares é confirmada, concomitantemente o uso dos

produtos biológicos interferem na inocuidade das vacinas (BOLIN; MATTHEWS; RIDPATH, 1991). Relatos de infecção ao BVDV após a administração de vacinas contra CSFV contaminadas são descritos (WENSVOORT, 1989; YANG, 2011; TAO et al., 2013a). Tao et al. (2013b) também detectaram uma estirpe de BVDV-2 a partir de uma vacina para CSFV.

No Brasil, a vacinação de suínos contra a PSC é proibida em todo território nacional desde o ano de 1998, exceto em casos excepcionais, onde seja configurado o risco de disseminação da infecção, e após um estudo epidemiológico, o emprego emergencial da vacina fica a critério do serviço oficial (BRASIL, 1998).

A estreita relação apresentada pelos dois vírus e também a susceptibilidade apresentada pelos suínos a ambos agentes podem complicar, de forma direta, o diagnóstico laboratorial, já que as técnicas utilizadas para triagem não permitem a diferenciação sorológica das infecções. O reflexo desse entrave é realçado para países em fase de erradicação, sobretudo para a vigilância sorológica (FRIAS LEPOUREAU; PERCEDO ABREU, 2003).

2.3 Sinais clínicos observados nas diferentes espécies

Em bovinos, a manifestação clínica da infecção por BVDV pode variar de acordo com diferentes fatores, tais como a estirpe viral, o estado imune do hospedeiro e o estado reprodutivo (RIDPATH, 2010). Em rebanhos em que a doença é endêmica, os principais sinais clínicos e, muitas vezes, os únicos observados, são as falhas reprodutivas, visto que a enfermidade ocorre frequentemente sem sinais clínicos em animais adultos (FLORES et al., 2005).

Porém, a infecção por BVDV pode resultar em uma forma aguda, caracterizada por, febre, leucopenia, depressão, anorexia, descarga oculonasal, erosões e ulcerações na mucosa oral, diarreia, diminuição da produção de leite e, em alguns casos, aumento da frequência respiratória (GROOMS et al., 2002). A forma aguda pode ainda se manifestar em quadros hemorrágicos, como trombocitopenia, diarreia sanguinolenta, epistaxe, hemorragias nas superfícies das mucosas e morte, esse quadro clínico está associado aos biótipos (ncp) (CORAPI et al., 1990). Entre os diversos sinais clínicos que podem ocorrer na forma aguda da

infecção, pode-se considerar a capacidade do vírus em interromper o desenvolvimento embrionário (DUBOVI, 1994), defeitos congênitos, como hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, atrofia ou displasia da retina e retardo no crescimento, bem como o desenvolvimento de animais persistentemente infectados (PI) (GROOMS et al., 2002).

As infecções por BVDV em suínos são, geralmente, sem sinais clínicos (CASTRUCCI et al., 1974; LEFORBAN et al., 1992; DAHLE et al., 1993a; DAHLE et al., 1993b; WALZ et al., 1999; WALZ et al., 2004) apesar de, em alguns casos, terem sido relatados, em animais adultos, problemas reprodutivos, nascimento de leitões fracos, aborto e mumificação fetal (VANNIER; ALBINA, 1999). A infecção intrauterina pelo BVDV pode levar a falhas reprodutivas semelhantes às produzidas por amostras de vírus da PSC de patogenicidade baixa ou média, causando infertilidade, abortos, malformações congênitas, natimortalidade e leitões com atraso no crescimento ou comprometimento neurológico (ROEHE; BRITO, 2012).

Em porcas prenhes, a infecção transplacentária ocorre, podendo causar abortos, natimortos, nascimento de leitegadas debilitadas, malformações e até o nascimento de leitões (PI) (PATON; DONE, 1994; BECHER et. al., 2003). Tao et al. (2013a) relataram ainda a ocorrência de cólicas intestinais e hipertermia em alguns animais adultos acometidos.

Casos em que a infecção pelo BVDV induziu grande quantidade de lesões em suínos adultos são causados por estirpes virais com longo histórico de passagem e infecções nesta espécie (TERPSTRA; WENSVOORT, 1988). Em leitões, a infecção por BVDV provoca como principais sinais clínicos: anemia, retardo no crescimento, animais-refugo, pelagem áspera, poliartrite, tremores congênitos, petéquias na pele, diarreia, conjuntivite e cianose de extremidades (TERPSTRA; WENSVOORT, 1988).

Ainda assim, a infecção pós-natal de suínos por BVDV é considerada praticamente inofensiva, ao contrário das infecções pelo CSFV, que acomete os rebanhos com alta mortalidade (MOENNING, 1990).

Entre as pestiviroses, apenas a PSC é classificada como doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A PSC ocorre apenas em suínos domésticos e javalis, é uma enfermidade que causa alta

mortalidade, e é caracterizada por febre alta, letargia, diarreia amarelada e lesões de pele, orelhas, abdômen e pernas (MOENNIG et al., 2003).

2.4 Técnicas diagnósticas

O BVDV tem uma característica múltipla de apresentações clínicas, que se estendem desde formas subclínicas a agudas, podendo apresentar sinais clínicos similares aos causados por outros agentes (GROOMS, 2006). Dessa forma, o diagnóstico final do BVDV é baseado em testes laboratoriais e dados epidemiológicos (SANDVIK, 2004).

Em relação aos métodos indiretos, a virusneutralização (VN) é o teste-padrão de referência (OIE, 2012). A desvantagem da VN é por se tratar de uma técnica que necessita de um cultivo celular, é laboriosa e demanda um tempo relativamente longo (DUBOVI, 2013). Porém, sua vantagem é poder ser utilizada no diagnóstico de BVDV independente da espécie estudada (SANDVIK, 2004). Um parâmetro a ser levado em consideração, é a estirpe viral utilizada, pois a sensibilidade do teste depende da homologia da estirpe utilizada no diagnóstico, bem como da estirpe predominante no campo (DUBOVI, 2013).

Dos métodos diretos, o isolamento viral (IV) em cultivo celular é recomendado pela OIE (OIE, 2012). Porém, este teste é dependente da posterior identificação do agente; faz-se necessária a utilização de outra técnica direta, como a transcrição reversa combinada à reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) (DUBOVI, 2013).

A RT-PCR tem sido empregada por ser uma técnica altamente sensível e fornecer resultados mais rápidos que o IV (SALIKI; DUBOVI, 2004), além de poder ser utilizada uma grande variedade de amostras, como soro sanguíneo, leite, urina, sangue total, suabes, pele e tecidos; contudo, cada tipo de amostra apresenta particularidades nas metodologias (GOYAL, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Verificar a prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em suínos abatidos em matadouros-frigorífico.

3.2. Objetivos específicos

- verificar a prevalência de anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2 em suínos terminados;
- gerar informações sobre a prevalência de BVDV conforme a origem dos animais (estados e municípios);
- investigar associações entre a prevalência da infecção e fatores de risco;
- verificar os títulos de anticorpos em amostras positivas testadas frente a 100 TCID₅₀ e a 50 TCID₅₀;
- detectar a presença de anticorpos específicos para CSFV em amostras sororreagentes ao BVDV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp, Jaboticabal – SP, com o título “Estudo epidemiológico de ocorrência e transmissão do vírus da diarreia viral bovina em suínos” e foi aprovado com o número de protocolo 07998/14 (Anexo I). O projeto teve auxílio - pesquisa – projeto regular pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo - Processo FAPESP nº 2014/13590-3.

4.1. Seleção das amostras

Foram coletadas 1930 amostras de sangue de suínos com idade entre 5 a 6 meses de idade, porém durante os testes de virusneutralização (VN), foram descartadas 120 amostras contaminadas e 105 amostras com citotoxicidade, portanto foi utilizado neste estudo um total de 1705 amostras. Os estabelecimentos de abate foram escolhidos para o projeto levando em consideração a proximidade da cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Em todos, obteve-se a autorização do matadouro e do serviço de inspeção para realização das coletas.

Todas as 1705 amostras de soro sanguíneo analisadas eram procedentes de suínos terminados, totalizando 33 rebanhos, que foram abatidos em dois matadouros-frigorífico. A Tabela 1 elenca o total de amostras coletadas e respectivas origens.

Procedeu-se à coleta de 882 amostras no período de agosto a dezembro de 2013, em um estabelecimento de abate de suínos que possuía o Serviço de Inspeção Estadual – SISP, localizado no município de Guariba, região Nordeste do estado de São Paulo. As outras 823 amostras foram coletadas no período de fevereiro a junho de 2014, em um estabelecimento que possuía o Serviço de Inspeção Federal - SIF, localizado no município de Ipuã, mesma região do estado.

Em ambos os frigoríficos, eram abatidos no máximo 200 animais diariamente, em dias alternados da semana. Os frigoríficos recebiam animais de todo o Brasil, com mais frequência dos estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul.

As coletas foram realizadas em todos os animais dos lotes no momento da sangria, sendo que os lotes de propriedades iguais foram excluídos da coleta, evitando assim duplicidade. Definiu-se como lote o total de animais descritos na Guia de Trânsito Animal – GTA, porque tinham a mesma origem (propriedade), transporte e idade padronizados. Os animais abatidos no período do estudo procederam de sete estados brasileiros: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 1, 2, 3 e 4).

Os municípios de origem dos animais amostrados estão dispostos na Tabela 1, e a localização geográfica dos mesmos na Figura 1, 2, 3 e 4, representando assim a diversidade da amostragem. Vale ressaltar que em alguns municípios foi amostrada mais de uma propriedade (Tabela 1).

4.2. Amostragem

Foi determinado o número de amostragem de forma a estimar a prevalência do BVDV em suínos com razoável precisão.

Segue a estatística e fórmula utilizada para a determinação das amostras mínimas que deverão ser colhidas.

$$n = \left(\frac{1,96}{d} \right)^2 \times \frac{[(S \cdot p) + (1 - E)(1 - p)] [(1 - S \cdot p) - (1 - E)(1 - p)]}{(S + E - 1)^2}$$

(THRUSFIELD, 2010)

Onde:

Z= 1,96

p= 0,05 (prevalência esperada)

d= 0,02 (erro admitido)

N= 13.500 (população)

S= 0,8 (sensibilidade)

E= 1 (especificidade)

nc= amostra corrigida de acordo com a população

$$nc = (N \cdot n) / (N + n)$$

Foi determinado o número mínimo de 553 animais para cada matadouro-frigorífico. A amostra não foi aleatória; durante o período de coleta, as amostras foram obtidas de acordo com o abate de animais de diferentes propriedades. Devido à disponibilidade de se realizar mais coletas, no período do estudo, foram totalizadas 1705 amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Número de amostras de soro sanguíneo, coletadas em matadouros-frigorífico no estado de São Paulo, das diferentes propriedades no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| Amostras | | |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Propriedade | Município/estado | Nº de amostras |
| 1 | Siqueira Campos/PR ¹ | 255 |
| 2 | Rodeio Bonito/RS | 98 |
| 3 | Siqueira Campos/PR ¹ | 104 |
| 4 | Guariba/SP | 49 |
| 5 | Cristais Paulista/SP | 27 |
| 6 | Colina/SP | 120 |
| 7 | Concórdia/SC | 104 |
| 8 | Rio Verde/GO ² | 61 |
| 9 | Jaboticabal/SP ³ | 64 |
| 10 | Jaboticabal/SP ³ | 31 |
| 11 | Saudades/SC ⁴ | 128 |
| 12 | Vicentina/MS | 50 |
| 13 | Laranjeiras do Sul/PR | 30 |
| 14 | Campo Grande/MS | 30 |
| 15 | Nova Erechim/SC | 30 |
| 16 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 |
| 17 | Ipuã/SP | 31 |
| 18 | Dourados/MS | 30 |
| 19 | Iomerê/SC | 30 |
| 20 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 |
| 21 | Primavera do Leste/MT | 30 |
| 22 | Pinhalzinho/SC ⁶ | 30 |
| 23 | União do Oeste/SC | 30 |
| 24 | Salto Veloso/SC | 30 |
| 25 | Rio Verde/GO ² | 30 |
| 26 | Pinhalzinho/SC ⁶ | 27 |
| 27 | Espigão Alto do Iguaçu/PR | 29 |
| 28 | Saudades/SC ⁴ | 29 |
| 29 | Chapecó/SC | 30 |
| 30 | Ponta Porã/MS | 30 |
| 31 | Monte Alto/SP | 28 |
| 32 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 |
| 33 | Itiquira/MT | 20 |
| Total | | 1705 |

^{1,2,3,4,5,6} Números iguais indicam mesmo município de origem, porém propriedades diferentes.

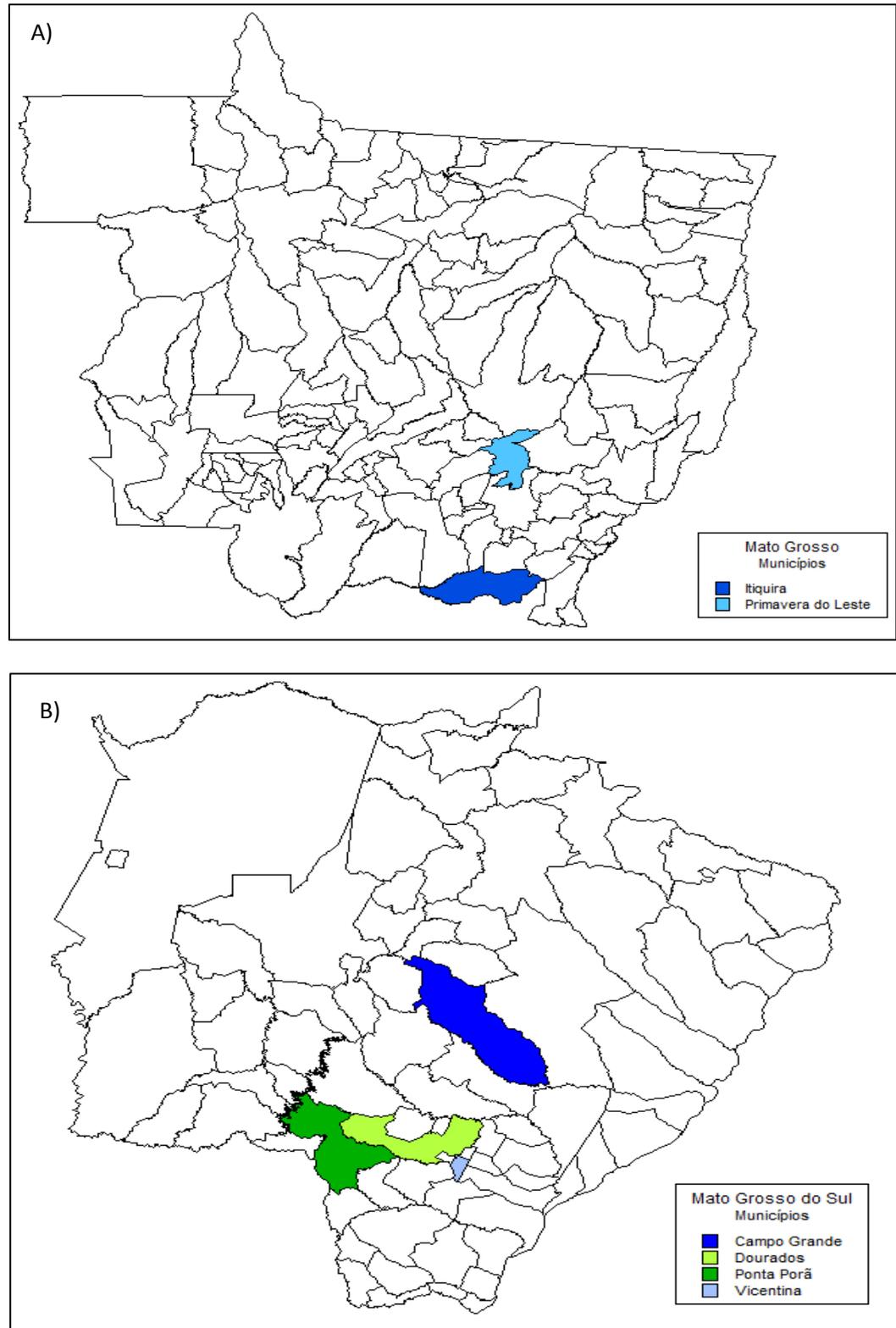


Figura 1. Mapa com a localização geográfica dos municípios do estado do Mato Grosso (A) e estado do Mato Grosso do Sul (B), da região Centro-oeste, Brasil, onde foram coletadas as amostras no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14.

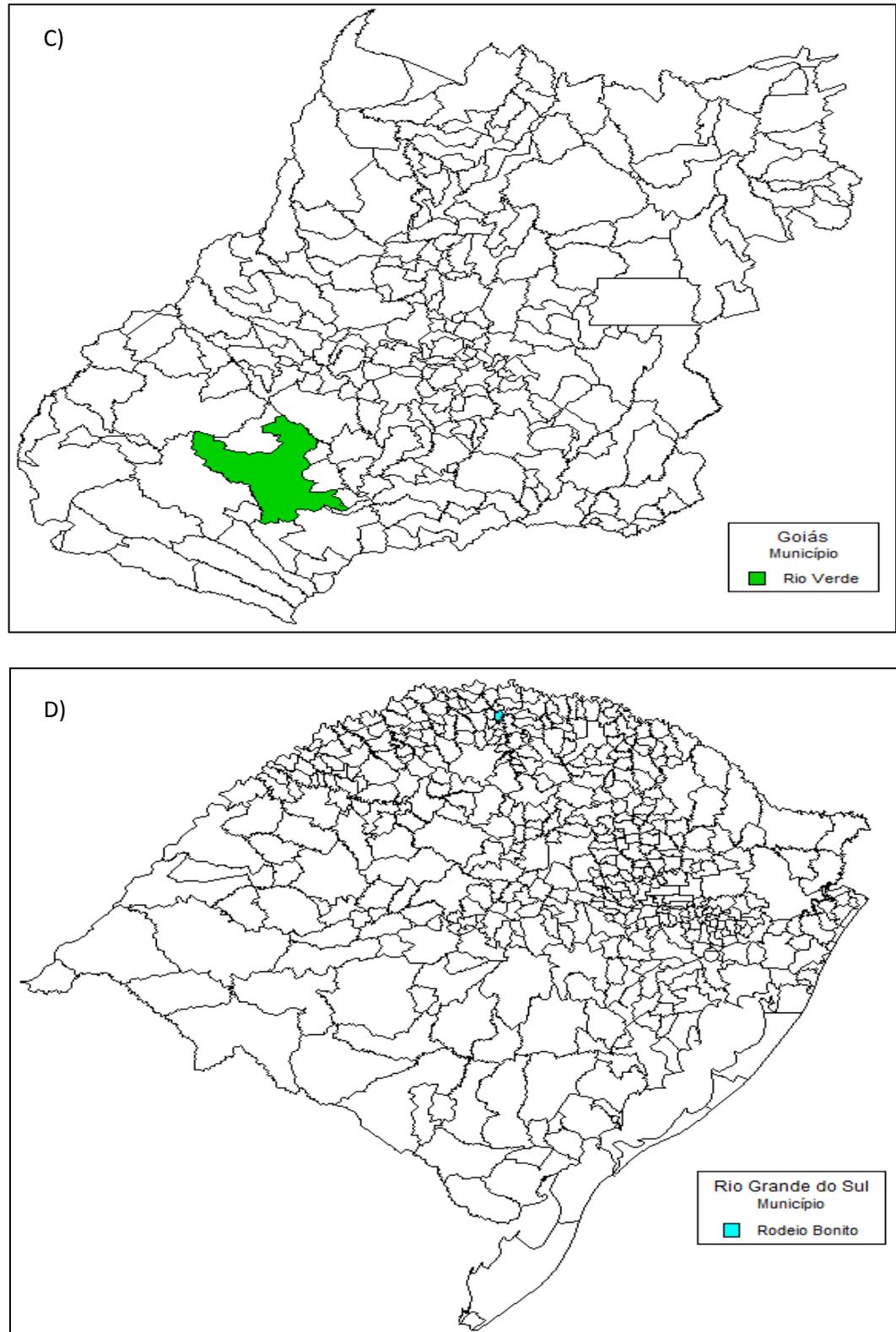


Figura 2. Mapa com a localização geográfica dos municípios do estado de Goiás (C) e estado do Rio Grande do Sul (D), da região Centro-oeste e Sudeste, Brasil, onde foram coletadas as amostras no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

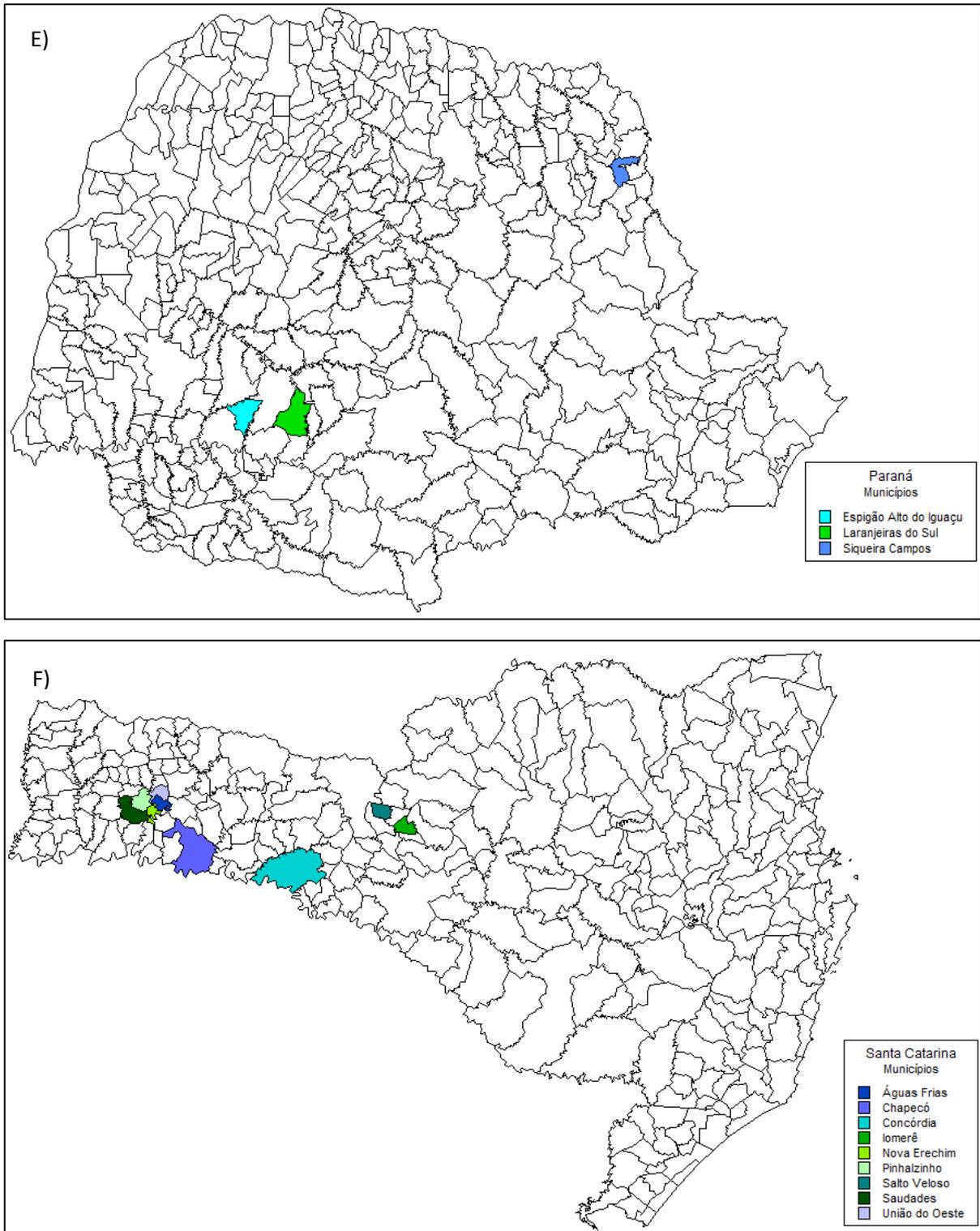


Figura 3. Mapa com a localização geográfica dos municípios do estado do Paraná (E) e estado de Santa Catarina (F), da região Sul, Brasil, onde foram coletadas as amostras no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

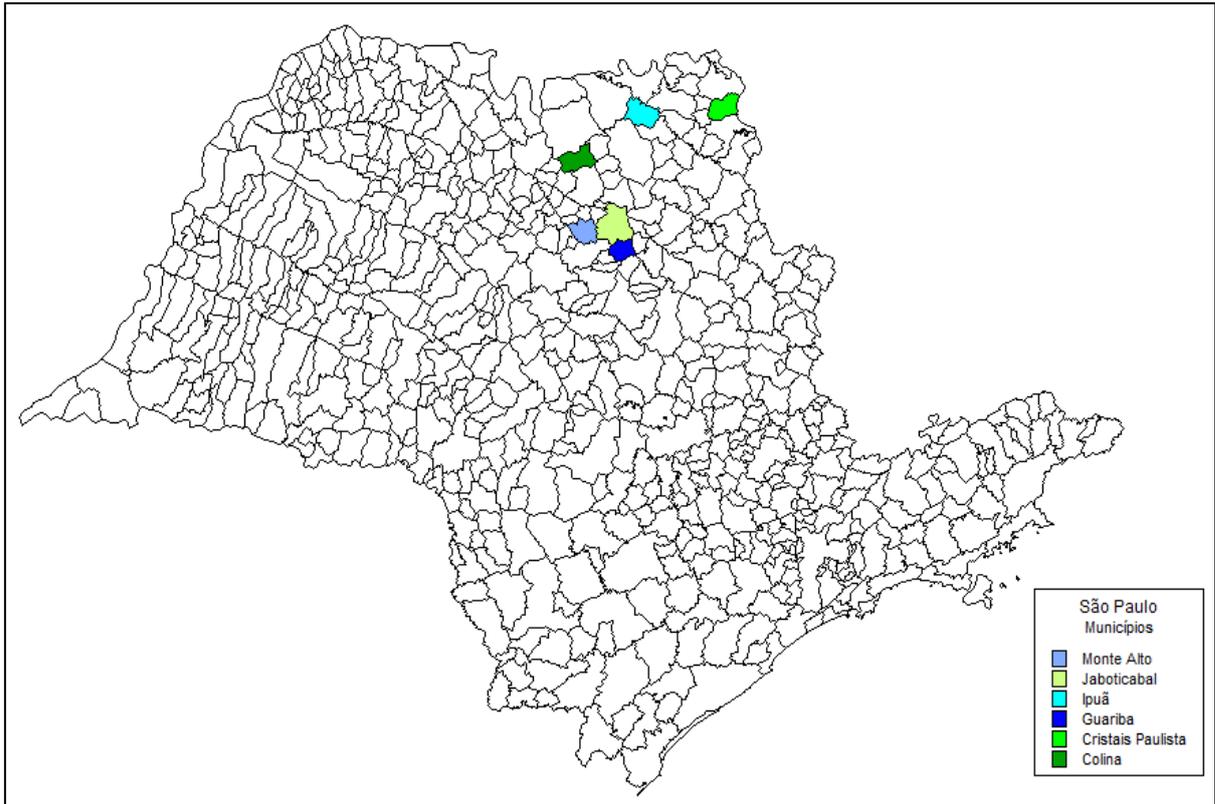


Figura 4. Mapa do estado de São Paulo destacando o município onde está localizada a propriedade com amostras coletadas, no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

4.3. Método de coleta

As amostras de sangue foram colhidas no momento da sangria, na linha de matança, em tubos descartáveis BD[®]. Ao final de cada coleta, as amostras foram transferidas para o Laboratório de Viroses da Reprodução, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus Jaboticabal – SP, onde foram deixadas à temperatura ambiente durante 3 horas para coagulação e posterior armazenagem em temperatura de 2°C a 8°C, até o momento de serem centrifugadas a 3.000 G por 10 minutos, não ultrapassando um período de 24 horas, devido à possível ocorrência de hemólise.

Os soros obtidos foram transferidos para microtubos de polipropileno em duas alíquotas, devidamente identificadas com número sequencial de amostras e lotes, armazenadas a uma temperatura de -20°C, até o momento da realização dos testes sorológicos.

Dados das propriedades de origem dos animais foram obtidos por meio da Guia de Trânsito Animal (GTA). Este documento proporcionou o rastreamento por meio dos serviços de defesa sanitária animal nos estados de origem e que possuíam o cadastramento das propriedades amostradas. Após autorização e disponibilização pelos órgãos oficiais dos contatos dos estabelecimentos, foi possível realizar um questionário de caráter epidemiológico nas propriedades para levantamento de possíveis fatores de risco associados com a prevalência da infecção do BVDV em suínos.

4.4. Teste de virusneutralização (VN)

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 for Terrestrial Animals*” (OIE, 2012). Os testes foram realizados no Laboratório de Viroses da Reprodução, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus 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.

Todas as amostras sororreagentes não só foram retestadas para a certeza do resultado, como também foram testadas em duplicata a fim de ser calculada a média geométrica (GMT) dos dois valores de títulos obtidos.

As amostras sororreagentes no teste com 100 TCID₅₀ foram testadas novamente com 50 TCID₅₀, com objetivo de encontrar alguma modificação na identificação do título viral.

4.4.1. Manutenção das culturas celulares

Foram utilizadas células MDBK cultivadas por cultura em monocamada em garrafas de poliestireno descartáveis para cultivo TPP®, com área de 75 cm² (T75),

em estufa a 37°C, utilizando meio de manutenção “Minimum Essential Medium” (Eagle- MEM) Gibco[®], filtrado, sem antibióticos, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio e de 10% de soro fetal bovino (SFB) Cultilab[®] livre de pestivírus, anticorpos contra o BVDV e micoplasma.

A manutenção das células era realizada a cada 72 horas por meio de subcultivos. Nesta etapa, o meio de manutenção era desprezado, e a monocamada recebia tratamento com solução de tripsina Difco[®], por um tempo máximo de 5 minutos em estufa a 37°C, sempre verificando a opacidade que a solução gera na monocamada quando está ocorrendo a individualização das células.

Transcorrido o tempo de reação da tripsina, ela era descartada, e eram realizadas leves batidas na garrafa, para auxiliar no desprendimento da monocamada. Essas células foram previamente contadas em câmara de Neubauer, e uma concentração aproximada de 200.000 células/mL era ressuspensas com a adição de meio de manutenção com 10% de SFB.

Por fim, as novas garrafas eram incubadas em estufa a 37°C para formação de uma nova monocamada.

4.4.2. Multiplicação do vírus padrão

Amostras cp do BVDV-1 (estirpe Singer) e do BVDV-2 (estirpe VS-253) foram multiplicadas em garrafas com área de 75 cm² (T75) com monocamada pré-formada de células MDBK, acrescidas por meio de manutenção Eagle-MEM.

Independentemente do genótipo, o vírus-padrão era multiplicado a partir da inoculação de 1 mL da suspensão viral, em garrafas com monocamada pré-formada com tempo de 24 horas de preparação e uma concentração de 200.000 células/mL. O meio de manutenção da monocamada era retirado e, após isso, era realizada a inoculação. A garrafa então permanecia durante 1 hora a 37°C, para ocorrer a adsorção do vírus às células.

Decorrida a duração de 60 minutos, eram adicionados 5 mL de meio de manutenção e suplementada com 5% de SFB. Mais uma vez, a garrafa era incubada a 37°C até que o tapete-celular demonstrasse de 80% a 90% de efeito citopático (ECP).

Depois de apresentar o ECP desejável, a garrafa era submetida ao congelamento a -20°C e, logo após essa etapa, era realizado o descongelamento rápido, com a função de romper as células e liberar as partículas virais. O volume era colocado em tubos de 15 mL e submetido à centrifugação refrigerada (4°C) a 5.000 G durante 15 minutos para sedimentação dos resíduos. O sobrenadante com as partículas virais era distribuído, no volume de 0,6 mL, em criotubos e armazenado no nitrogênio líquido a -196°C . Uma amostra era selecionada e realizada a titulação viral.

4.4.3. Titulação viral

A titulação viral era realizada em placas de microtitulação descartáveis de poliestireno cristal com 96 cavidades e fundo chato TPP[®]. Foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) a partir de 0,5 mL de suspensão viral em 4,5 mL de meio de manutenção Eagle-MEM. Na placa, foram dispostas nas oito primeiras colunas 50 μL de cada diluição por cavidade, em 8 repetições. A cada coluna foram adicionados mais 50 μL de meio de manutenção. As duas últimas colunas foram reservadas para o controle de suspensão celular, com 100 μL de meio de manutenção.

Após a distribuição na placa das diluições, foram adicionados 50 μL de suspensão celular contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção com 10% SFB em todos os poços, com exceção das colunas divisórias. A placa era incubada a 37°C , com atmosfera controlada de 5% de CO_2 , durante 96 horas. Na leitura, era visualizado o ECP e o TCID_{50} obtido pelo método de REED e MUENCH (1938). Nas reações realizadas durante o estudo, foi utilizado um título de $10^{6,3}/50 \mu\text{L}$ para BVDV-1 (Singer) e de $10^{5,33}/50 \mu\text{L}$ para BVDV-2 (VS-253).

4.4.4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes

Foi utilizada a técnica de virusneutralização (VN) para a pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o BVDV-1 e o BVDV-2 em todas as amostras de

soro sanguíneo coletadas. As amostras foram submetidas à VN em duplicata, com diluições progressivas entre 1:10 até a diluição 1:5.120.

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e realizada a inativação do complemento em banho-maria a 56°C durante 30 minutos. As diluições das amostras foram realizadas em placas descartáveis de microtitulação de 96 cavidades com fundo plano, utilizando o meio de manutenção Eagle-MEM, com adição de 1% de uma solução de penicilina (10.000 UI/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e antifúngico Gibco®.

A VN compreende vários procedimentos, sendo eles: a primeira coluna da placa foi destinada ao controle de suspensão celular, sendo adicionados 100 µL de meio de manutenção; na segunda coluna, destinados ao controle de toxicidade, foram adicionados 90 µL de meio de manutenção e 10 µL do soro-teste; dessa forma, a primeira diluição testada (1:10) corresponde à diluição do controle de toxicidade. Na terceira coluna, que representa a diluição inicial, foram adicionados 80 µL de meio de manutenção e 20 µL do soro-teste, alcançando uma diluição inicial 1:5 da amostra. A partir da quarta até a décima segunda coluna, foram adicionados 50 µL de meio de manutenção, e diluições sucessivas foram realizadas. Depois da homogeneização, foram retirados 50 µL da terceira coluna, o volume era de 100 µL, e adicionados na quarta coluna, e repetições foram realizadas até a décima segunda coluna, de onde foram descartados 50 µL após a homogeneização final; desse modo, todas as cavidades destinadas às diluições sucessivas da amostra continham 50 µL.

Após a preparação da suspensão viral contendo 100 TCID₅₀ ou 50 TCID₅₀, dependendo da dose infectante utilizada para a VN, foram adicionados 50 µL da suspensão celular da terceira até a décima segunda coluna. Na primeira e na segunda colunas, não foi adicionada suspensão viral. Com a adição da suspensão viral, as diluições das amostras passaram a corresponder de 1:10 até 1:5.120, respectivamente da terceira à décima segunda coluna. As placas então foram incubadas a 37°C durante sessenta minutos, com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂.

A partir do tempo de incubação, foram adicionados 50 µL, em todas as cavidades, de uma suspensão de células MDBK, contendo 300.000 células/mL em

meio de manutenção, adicionadas de 10% de SFB. Após essa etapa, a placa foi incubada novamente em estufa com atmosfera controlada a 5% de CO₂, durante 96 horas.

Terminado esse período, foi realizada a leitura das placas em microscópio óptico invertido, iniciando a leitura pela coluna destinada ao controle de suspensão celular; em seguida, o controle de toxicidade e, posteriormente, a leitura das demais colunas, verificando a presença ou ausência de efeito citopático (ECP).

As amostras foram consideradas sororreagentes quando promoveram neutralização total de 100 TCID₅₀ ou 50TCID₅₀ do BVDV, dependendo da dose infectante utilizada. 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 (GMT) dos títulos encontrados nas duplicatas.

4.4.5. Controle da TCID₅₀ para 100 TCID

Para todas as reações, foi necessário validar os testes de acordo com a preconização do “*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals*” (OIE, 2012), que é entre 30 e 421 TCID₅₀. Para calcular as 100 TCID₅₀ que foram usadas na reação de VN, a partir do título viral, foi subtraído o logaritmo de 100 TCID₅₀ (2,0).

Foi utilizada para a placa de validação a mesma diluição para as 100 TCID₅₀. A partir das 100 TCID₅₀, foram definidas as diluições 1, 10 e 30 TCID₅₀. Para a obtenção da diluição de 30 TCID₅₀, foi diluído 0,6 mL de 100 TCID₅₀ em 1,4 mL de meio de manutenção Eagle-MEM, para o preparo de 10 TCID₅₀, foi adicionado 0,2 mL da diluição de 30 TCID₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção e, para o preparo da diluição de 1 TCID₅₀, foi diluído 0,2 mL da diluição de 10 TCID₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção.

Com as diluições prontas, foram dispensados 50 µL em uma placa de microtitulação de noventa e seis cavidades das respectivas diluições 1, 10, 30 e 100 TCID₅₀, cada diluição ocupando uma coluna de 8 cavidades. Na mesma placa, foram destinadas a décima primeira e a décima segunda colunas para o controle de

suspensão celular. A quinta coluna e a décima eram deixadas como colunas-limite, sem adição de tipo algum de reagente.

Ainda na mesma placa, foram realizados os mesmos procedimentos de titulação descritos no item 4.4.3 para confirmação do título viral utilizado, já que foi obtido a partir de uma das diluições (10^{-1} a 10^{-8}).

Na reação, o título viral utilizado era previamente conhecido; assim, na placa de retrotitulação, apenas 4 diluições próximas ao título foram utilizadas para confirmação. Foram adicionados 50 μ L de cada diluição viral entre a sexta e a nona colunas. Após 1 hora de incubação a 37°C, adicionaram-se 50 μ L da suspensão celular contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção com 10% de SFB em cada coluna que continha diluições virais.

A placa foi mantida durante 96 horas em estufa a 37°C com atmosfera controlada 5% de CO₂. Os resultados da placa de retrotitulação validam o teste.

4.4.6. Controle das TCID₅₀ para 50TCID

Foi realizada toda a técnica descrita no item 4.4.5, porém, para calcular as 50 TCID₅₀ usadas na reação de VN, a partir do título viral, foi subtraído o logaritmo de 50 TCID₅₀ (1,69).

4.5. Diagnóstico diferencial de peste suína clássica (PSC)

Devido a relatos em estudos de reação cruzada entre os diferentes pestivírus, principalmente entre o BVDV e o da CSFV, em todas as amostras sororreagentes ao BVDV, foi realizado a pesquisa de anticorpos específicos para a PSC.

Para tentar detectar a presença de anticorpos anti-PSC, foi aplicado o teste Enzyme Linked Imunossorbent Assay – ELISA ac¹, sendo o teste realizado no Instituto Biológico (IB/APTA São Paulo-SP). Se houvesse amostras sororreagentes a

¹ PrioCHECK® (CSFV Antibody 2.0 ELISA Kit, strip, Zurique, Suíça).

PSC, imediatamente o Serviço Estadual de Defesa Sanitária Animal seria comunicado para adoção das medidas previstas na legislação sanitária.

4.6. Aplicação do questionário

Foi aplicado questionário estruturado (Anexo II) aos proprietários com o objetivo de obter informações epidemiológicas do rebanho. Para confecção desse questionário, foram elencados os principais fatores de risco potencialmente relacionados à presença de infecção por BVDV em rebanhos suínos, sendo eles: número total de suínos; presença de funcionários que lidam com mais de uma espécie de animal; presença e quantidade de caprinos, ovinos e bovinos na mesma propriedade onde há criação de suínos; presença de caprinos, ovinos e bovinos em um raio de 3 km do rebanho suíno; ocorrência de problemas reprodutivos (abortamento, natimortos, mumificação, retorno ao cio) no rebanho suíno nos últimos 6 meses; ocorrência de problemas reprodutivos (abortamento, nascimento de crias fracas, natimortos, mumificação, retorno ao cio) em bovinos, caprinos e ovinos da propriedade; ocorrência de problemas reprodutivos (abortamento, nascimento de crias fracas, natimortos, mumificação, retorno ao cio) em suínos e em ruminantes das propriedades vizinhas; uso de leite de ruminantes ou derivados na alimentação dos suínos.

Questionamentos sobre a biossegurança da propriedade também foram incluídos. A ocorrência desses fatores nas propriedades foi preferencialmente inquirida aos responsáveis pelo manejo dos animais. Os dados obtidos foram analisados juntamente com os resultados dos testes laboratoriais das amostras.

4.7. Análise estatística

Foi feita estatística descritiva, com a distribuição de frequência e cálculo do intervalo de confiança das taxas de prevalência, usando a metodologia recomendada por Thrusfield (2010). Para a comparação entre as taxas de prevalência nos estados e nos municípios, foi utilizado o teste de χ^2 ou o teste exato de Fisher. Para verificar se as variáveis estavam associadas à ocorrência da

infecção, foi feita a análise univariada, com cálculo do risco relativo, seus respectivos intervalos de confiança e teste exato de Fisher. Para o BVDV-1, as variáveis com valor p menor que 0,2, na análise univariada, foram submetidas à análise de regressão logística multivariada. Para investigar a associação com a ocorrência do BVDV-2, as variáveis com valor p menor que 0,2, na análise univariada, foram submetidas à análise de regressão logística univariada. Em seguida, as variáveis com valor de p menor que 0,2 na regressão logística univariada, foram submetidas à análise de regressão logística multivariada. Os cálculos foram realizados empregando o *software* Epi Info 7.

Foi empregado o índice Kappa para avaliar a concordância entre a ocorrência de BVDV-1 e BVDV-2 nos lotes e para avaliar a concordância entre os testes de VN para animais sororreagentes ao genótipo 1, genótipo 2 ou aos dois genótipos.

Para verificar se houve concordância, nos testes de VN, em relação à dose infectante utilizada, de um mesmo genótipo, foram utilizados o índice Kappa e o teste Binomial.

As médias geométricas (GMT) dos títulos, das diferentes doses infectantes, utilizadas nos testes de VN, foram comparadas pelo teste de Wilcoxon.

5. RESULTADOS

5.1. Teste de VN para BVDV-1

Dos 1705 soros avaliados pelo teste de VN, foram detectadas 51 amostras sororreagentes para o genótipo 1 do BVDV, obtendo-se 3,0% (IC 95%: 2,28% a 3,91%) de positividade para a estirpe Singer (Figura 5).

As porcentagens de animais sororreagentes por propriedade variaram entre 1,18% a 16,67%. Os maiores percentuais foram detectados nos municípios de Primavera do Leste, estado de Mato Grosso, com 16,67% (5/30) (IC 95%: 7,34% a 33,56%); Laranjeiras do Sul, estado do Paraná, com 13,33% (4/30) (IC95%: 1,17% a 25,50%) e Saudades, estado de Santa Catarina, com 6,90% (2/29) (IC95%: 1,91% a 21,96%) (Tabela 2).

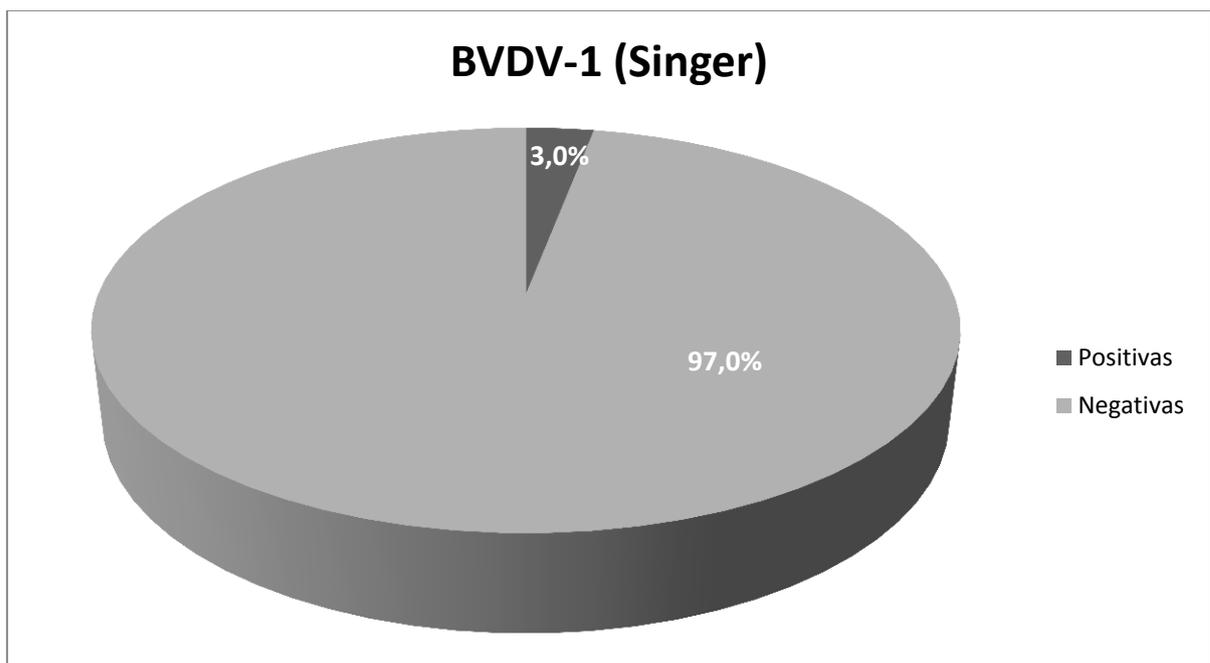


Figura 5. Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de virusneutralização, para detecção de anticorpos anti-BVDV-1 (Singer), em relação ao total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

Tabela 2. Municípios e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de virusneutralização para BVDV-1 (estirpe Singer), de um total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| Municípios | Reagentes | | IC 95 (%) | Total |
|------------------------------|-----------|-------|--------------|-------|
| | N | % | | |
| (Continua) | | | | |
| Goiás | | | | |
| Rio Verde ¹ | 2 | 3,28 | 0,90 a 11,19 | 61 |
| Rio Verde ¹ | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Mato Grosso do Sul | | | | |
| Campo Grande | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Dourados | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Ponta Porã | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Vicentina | 0 | 0 | 0 a 7,13 | 50 |
| Mato Grosso | | | | |
| Itiquira | 0 | 0 | 0 a 16,11 | 20 |
| Primavera do Leste | 5 | 16,67 | 7,34 a 33,56 | 30 |
| Paraná | | | | |
| Espigão Alto do Iguaçu | 0 | 0 | 0 a 11,70 | 29 |
| Laranjeiras do Sul | 4 | 13,33 | 1,17 a 25,50 | 30 |
| Siqueira Campos ² | 3 | 1,18 | 0,40 a 3,40 | 255 |
| Siqueira Campos ² | 2 | 1,92 | 0,53 a 6,74 | 104 |
| Rio Grande do Sul | | | | |
| Rodeio Bonito | 9 | 9,18 | 4,91 a 16,54 | 98 |
| Santa Catarina | | | | |
| Águas Frias ³ | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Águas Frias ³ | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Águas Frias ³ | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Concórdia | 2 | 1,92 | 0,53 a 6,74 | 104 |
| Chapecó | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Iomerê | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Nova Erechim | 2 | 6,67 | 1,85 a 21,32 | 30 |
| Pinhalzinho ⁴ | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Pinhalzinho ⁴ | 2 | 7,41 | 2,06 a 23,37 | 27 |
| Salto Veloso | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Saudades ⁵ | 5 | 3,91 | 1,68 a 8,82 | 128 |
| Saudades ⁵ | 2 | 6,90 | 1,91 a 21,96 | 29 |

Tabela 2: (Continuação)

| Municípios | Reagentes | | IC 95 (%) | Total |
|--------------------------|-----------|----------|--------------|-------------|
| | N | % | | |
| União do Oeste | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| São Paulo | | | | |
| Colina | 2 | 1,67 | 0,46 a 5,87 | 120 |
| Cristais Paulista | 0 | 0 | 0 a 12,46 | 27 |
| Guariba | 1 | 2,04 | 0,36 a 10,69 | 49 |
| Ipuã | 0 | 0 | 0 a 11,03 | 31 |
| Jaboticabal ⁶ | 3 | 4,69 | 1,61 a 12,90 | 64 |
| Jaboticabal ⁶ | 0 | 0 | 0 a 11,03 | 31 |
| Monte Alto | 0 | 0 | 0 a 12,06 | 28 |
| Total | 51 | 3 | - | 1705 |

^{1,2,3,4,5,6} Números iguais indicam mesmo município de origem, porém propriedades diferentes.

5.2. Teste de VN para BVDV-2

Dos 1705 soros avaliados submetidos ao teste de VN contra a BVDV-2, foram observadas 40 amostras sororreagentes para o genótipo 2 do BVDV, com 2,35% (IC 95%: 1,73 a 3,18) de positividade para a estirpe VS 253 (Figura 6).

As porcentagens de animais sororreagentes por propriedade variaram entre 0,78% a 7,41%. Os maiores percentuais de sororreagentes foram detectados nos municípios de Primavera do Leste, estado de Mato Grosso e Salto Veloso, estado de Santa Catarina, com 10% (3/30) (IC95%: 3,46% a 25,62%). No município de Pinhalzinho, estado de Santa Catarina, foram detectados 7,41% (2/27) (IC95%: 2,06% a 23,37%) de animais sororreagentes (Tabela 3).

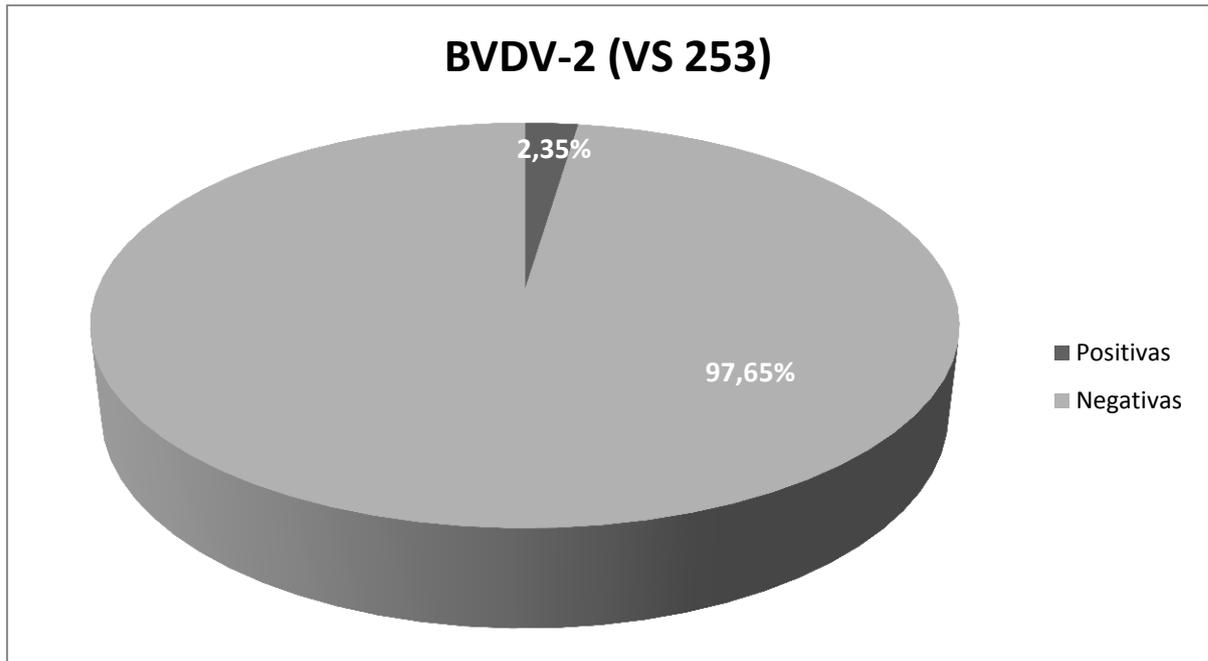


Figura 6. Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de virusneutralização, para detecção de anticorpos anti-BVDV-2 (VS 253), em relação ao total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

Tabela 3. Municípios e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de virusneutralização para BVDV-2 (estirpe VS 253), de um total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

(Continua)

| Municípios | Reagentes | | IC 95 (%) | Total N |
|---------------------------|-----------|------|--------------|------------|
| | N | % | | |
| Goiás | | | | |
| Rio Verde ¹ | 1 | 1,64 | 0,29 a 8,72 | 61 |
| Rio Verde ¹ | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Mato Grosso do Sul | | | | |
| Campo Grande | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Dourados | 2 | 6,67 | 1,85 a 21,32 | 30 |
| Ponta Porã | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Vicentina | 2 | 4 | 1,10 a 13,46 | 50 |
| Mato Grosso | | | | |
| Itiquira | 0 | 0 | 0 a 16,11 | 20 |
| Primavera do Leste | 3 | 10 | 3,46 a 25,62 | 30 |

Tabela 3: (Continuação)

| Municípios | Reagentes | | IC 95 (%) | Total |
|------------------------------|-----------|-------------|--------------|-------------|
| | N | % | | |
| Paraná | | | | |
| Espigão Alto do Iguaçu | 0 | 0 | 0 a 11,70 | 29 |
| Laranjeiras do Sul | 2 | 6,67 | 1,85 a 21,32 | 30 |
| Siqueira Campos ² | 7 | 2,75 | 1,34 a 5,56 | 255 |
| Siqueira Campos ² | 1 | 0,96 | 0,17 a 5,25 | 104 |
| Rio Grande do Sul | | | | |
| Rodeio Bonito | 2 | 2,04 | 0,56 a 7,14 | 98 |
| Santa Catarina | | | | |
| Águas Frias ³ | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Águas Frias ³ | 2 | 6,67 | 1,85 a 21,32 | 30 |
| Águas Frias ³ | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Concórdia | 1 | 0,96 | 0,17 a 5,25 | 104 |
| Chapecó | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Iomerê | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| Nova Erechim | 0 | 0 | 0 a 11,35 | 30 |
| Pinhalzinho ⁴ | 2 | 6,67 | 1,85 a 21,32 | 30 |
| Pinhalzinho ⁴ | 2 | 7,41 | 2,06 a 23,37 | 27 |
| Salto Veloso | 3 | 10 | 3,46 a 25,62 | 30 |
| Saudades ⁵ | 1 | 0,78 | 0,14 a 4,29 | 128 |
| Saudades ⁵ | 0 | 0 | 0 a 11,70 | 29 |
| União do Oeste | 1 | 3,33 | 0,59 a 16,67 | 30 |
| São Paulo | | | | |
| Colina | 2 | 1,67 | 0,46 a 5,87 | 120 |
| Cristais Paulista | 0 | 0 | 0 a 12,46 | 27 |
| Guariba | 0 | 0 | 0 a 7,27 | 49 |
| Ipuã | 2 | 6,45 | 1,79 a 20,72 | 31 |
| Jaboticabal ⁶ | 0 | 0 | 0 a 5,66 | 64 |
| Jaboticabal ⁶ | 0 | 0 | 0 a 11,03 | 31 |
| Monte Alto | 0 | 0 | 0 a 12,06 | 28 |
| Total | 40 | 2,35 | - | 1705 |

^{1,2,3,4,5,6} Números iguais indicam mesmo município de origem, porém propriedades diferentes.

5.3. Análise dos resultados sorológicos para os genótipos 1 e 2 de BVDV

Para ambas as estirpes testadas, 63,6% (21/33) (IC95%: 47,22 a 80,05) das propriedades apresentaram animais sororreagentes ao BVDV (Figura 7).

Considerando as propriedades que apresentaram animais sororreagentes ao BVDV-1, 71,4% (15/21) (IC 95%: 52,11 a 90,75) reagiram aos genótipos 1 e 2. Contudo os animais sororreagentes aos genótipos 1 e 2 não foram os mesmos dentro da mesma propriedade. Apenas 23,8% (5/21) (IC 95%: 5,59 a 42,03) das propriedades tiveram amostras de animais que reagiram somente contra o genótipo 1 (Figura 8).

Em relação às propriedades que tiveram animais sororreagentes contra o genótipo, 2, 66,6% (14/21) (IC 95%: 46,50 a 86,83) delas apresentaram animais sororreagentes tanto ao genótipo 1 como ao genótipo 2. Porém, conforme observado anteriormente, os animais sororreagentes aos genótipos 1 e 2 não foram os mesmos dentro da mesma propriedade. Apenas 28,6% (6/21) (IC 95%: 9,25 a 47,89) das propriedades tiveram animais sororreagentes somente contra o genótipo 2 (Figura 8).

Considerando as animais que foram sororreagentes aos dois genótipos, apenas 4,8% (1/21) (IC 95%: 0,85 a 22,67) das propriedades tiveram animais que reagiram ao genótipo 1 e 2 simultaneamente (Figura 8).

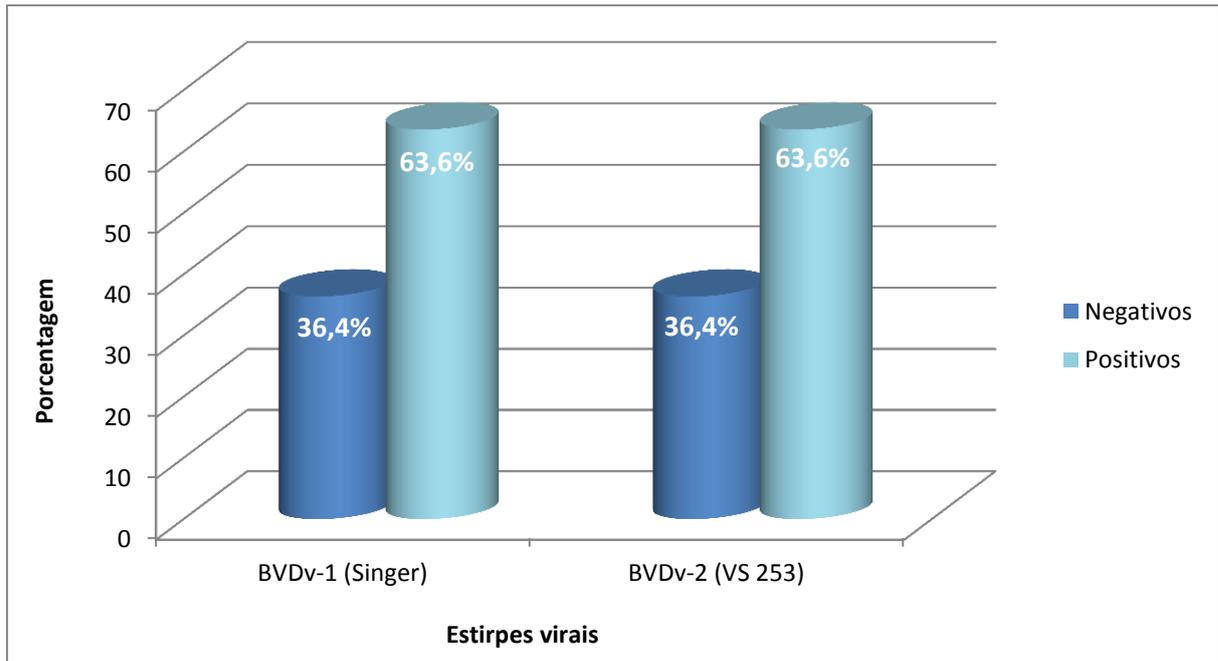


Figura 7. Representação gráfica da porcentagem de propriedades com amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de VN, contra a estirpe de BVDV-1 (Singer) e contra a estirpe BVDV-2 (VS 253), em relação ao total de 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

A análise estatística revelou uma concordância sofrível quando comparada as propriedades com animais sororreagentes contra o genótipo 1 e 2, $\kappa=0,3452$ (IC 95%: 0,0041 a 0,6864).

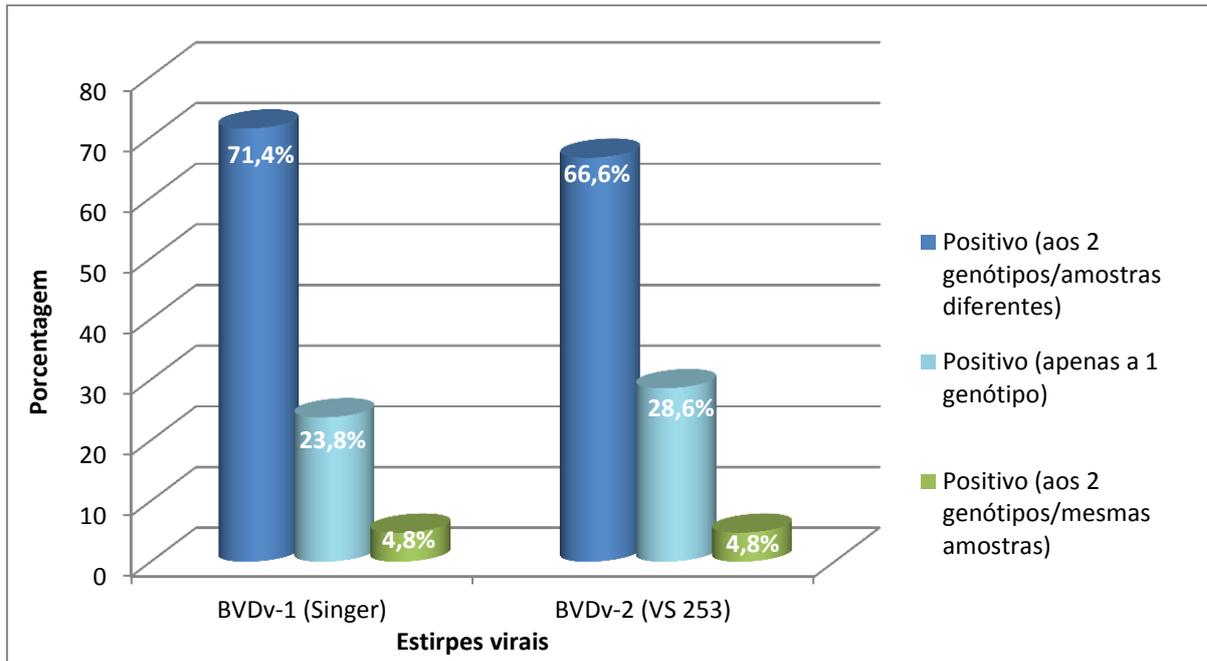


Figura 8. Representação gráfica da porcentagem de propriedades com amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes no teste de VN, contra a estirpe de BVDV-1 (Singer) e contra a estirpe BVDV-2(VS 253), em relação ao total das 33 propriedades coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

5.4. Reação cruzada entre BVDV-1 e 2

Dos 1705 soros analisados, somente 0,1% (2/1705) apresentou reatividade cruzada ao BVDV-1 e ao BVDV-2. Os títulos de anticorpos neutralizantes detectados nos soros com reatividade cruzada foram iguais, não sendo possível fazer a diferenciação pelo teste de VN (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação das reações de VN ao BVDV-1 e ao BVDV-2 realizadas em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| | | BVDV-1 (Singer) | | |
|--------------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| | | Reagentes | Não reagentes | Total |
| BVDV-2 (VS 253) | Reagentes | 2 (0,1%) | 38 (2,2%) | 40 (2,35%) |
| | Não Reagentes | 49 (2,9%) | 1616 (94,8%) | 1665 (97,65%) |
| | Total | 51(3,0%) | 1654 (97,0%) | 1705 (100%) |

A análise estatística revelou uma concordância fraca em relação às amostras sororreagentes ao BVDV-1 e ao BVDV-2, $\kappa = 0,0181$ (IC 95%: -0,029 a 0,0652).

5.5. Prevalência de BVDV conforme os estados de origem dos animais

De acordo com a tabela, verifica-se que o maior percentual de animais sororreagentes ao BVDV-1 foi respectivamente nos estados de Mato Grosso, com 10% (5/50); Rio Grande do Sul com 9,18% (9/98) e Goiás com 3,29% (3/91) de amostras sororreagentes (Tabela 5, Figura 9).

Tabela 5. Frequência (%) e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes ao BVDV-1 (Singer) pelo teste de virusneutralização de acordo com estado de origem, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| Estado | Total | Reagentes | IC (95%) | (%) |
|--------------------|-------------|-----------|--------------|---------------------|
| Goiás | 91 | 3 | 1,13 a 9,25 | 3,29 ^{a,b} |
| Mato Grosso do Sul | 140 | 2 | 0,39 a 5,06 | 1,43 ^a |
| Mato Grosso | 50 | 5 | 4,34 a 21,36 | 10,00 ^b |
| Paraná | 418 | 9 | 1,14 a 4,04 | 2,15 ^a |
| Rio Grande do Sul | 98 | 9 | 3,47 a 14,90 | 9,18 ^b |
| Santa Catarina | 558 | 17 | 1,91 a 4,82 | 3,05 ^a |
| São Paulo | 350 | 6 | 0,79 a 3,69 | 1,71 ^a |
| Total | 1705 | 51 | - | - |

^{a,b}: letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de X^2 .

IC: intervalo de confiança.

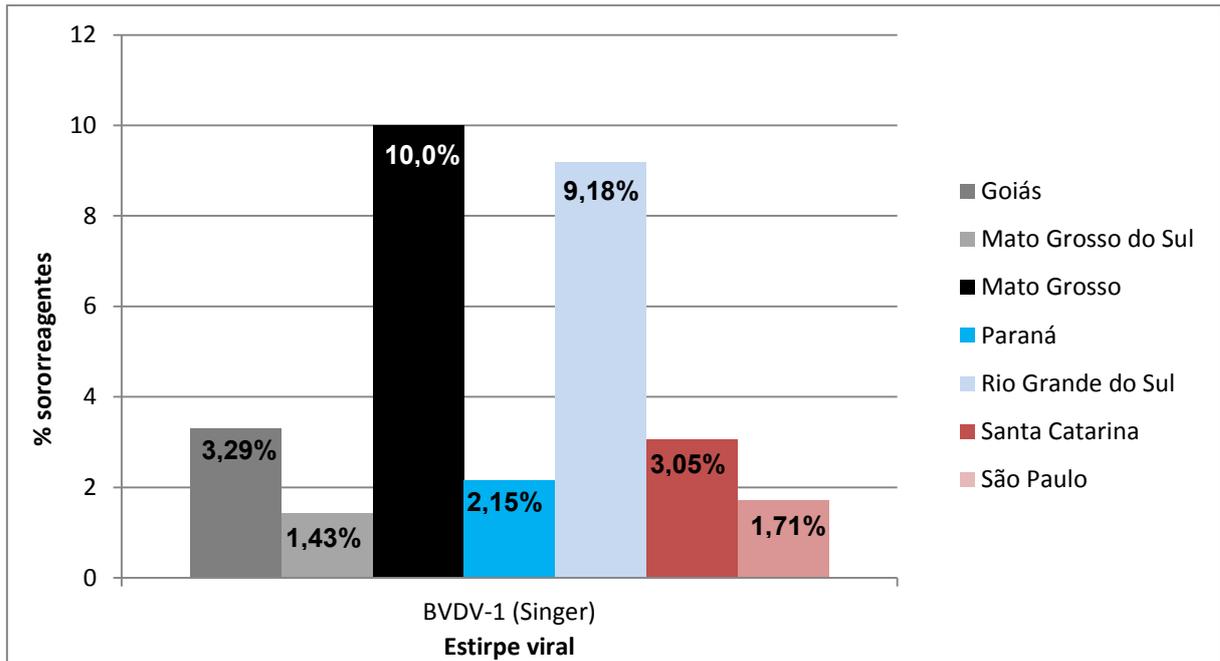


Figura 9. Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de VN para detecção de anticorpos anti-BVDV-1 (Singer), de acordo com os estados de origem das 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

Após análise pelo teste X^2 , concluiu-se que existe diferença significativa entre as prevalências nos estados. Observou-se que a taxa do estado de Mato Grosso do Sul difere da de Mato Grosso, $p=0,01446$, $RR=7,00$ e (IC 95%: 1,40-34,94); a de Mato Grosso do Sul difere da do Rio Grande do Sul, $p=0,00878$, $RR= 6,42$ e (IC 95%: 1,42-29,11); a de Mato Grosso difere da do Paraná, $p=0,01086$, $RR= 4,64$ e (IC 95%:1,62-13,31); a de Mato Grosso difere da de Santa Catarina, $p=0,02767$, $RR=3,28$ e (IC 95%: 1,26-8,52); a de Mato Grosso difere da de São Paulo, $p=0,00647$, $RR=5,83$ e (IC 95%: 1,85-18,41); a do Paraná difere da do Rio Grande do Sul, $p=0,00244$, $RR=4,26$ e (IC 95%: 1,74-10,46); a do Rio Grande do Sul difere da de Santa Catarina, $p= 0,00890$, $RR= 3,01$ e (IC 95%: 1,38-6,57) e a do Rio Grande do Sul difere da de São Paulo, $p=0,00127$, $RR=5,35$ e (IC 95%: 1,95-14,69).

De acordo com a Tabela 6, verifica-se que o maior percentual de animais sororreagentes ao BVDV-2 foi encontrado respectivamente nos estados de Mato Grosso, com 6,0% (3/50); Mato Grosso do Sul com 4,29% (6/140) e Santa Catarina com 2,51% (14/558) de amostras sororreagentes.

Tabela 6. Frequência (%) e número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes ao BVDV-2 (VS 253) pelo teste de virusneutralização de acordo com estado de origem, Guariba/lpuã, SP, 2013/14.

| Estado | Total | Reagentes | IC (95%) | (%) |
|---------------------------|--------------|------------------|-----------------|-------------------|
| Goiás | 91 | 1 | 0,19 a 5,97 | 1,10 ^a |
| Mato Grosso do Sul | 140 | 6 | 1,98 a 9,03 | 4,29 ^a |
| Mato Grosso | 50 | 3 | 2,06 a 16,22 | 6,0 ^a |
| Paraná | 418 | 10 | 1,30 a 4,35 | 2,4 ^a |
| Rio Grande do Sul | 98 | 2 | 0,56 a 7,14 | 2,0 ^a |
| Santa Catarina | 558 | 14 | 1,50 a 4,17 | 2,51 ^a |
| São Paulo | 350 | 4 | 0,45 a 2,90 | 1,14 ^a |
| Total | 1705 | 40 | - | - |

^a: letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Exato de Fisher.
IC: intervalo de confiança

A frequência de animais sororreagentes para o BVDV-2 por estado de origem variou de 1,10% (estado de Goiás) a 6,0% (estado de Mato Grosso) (Figura 10).

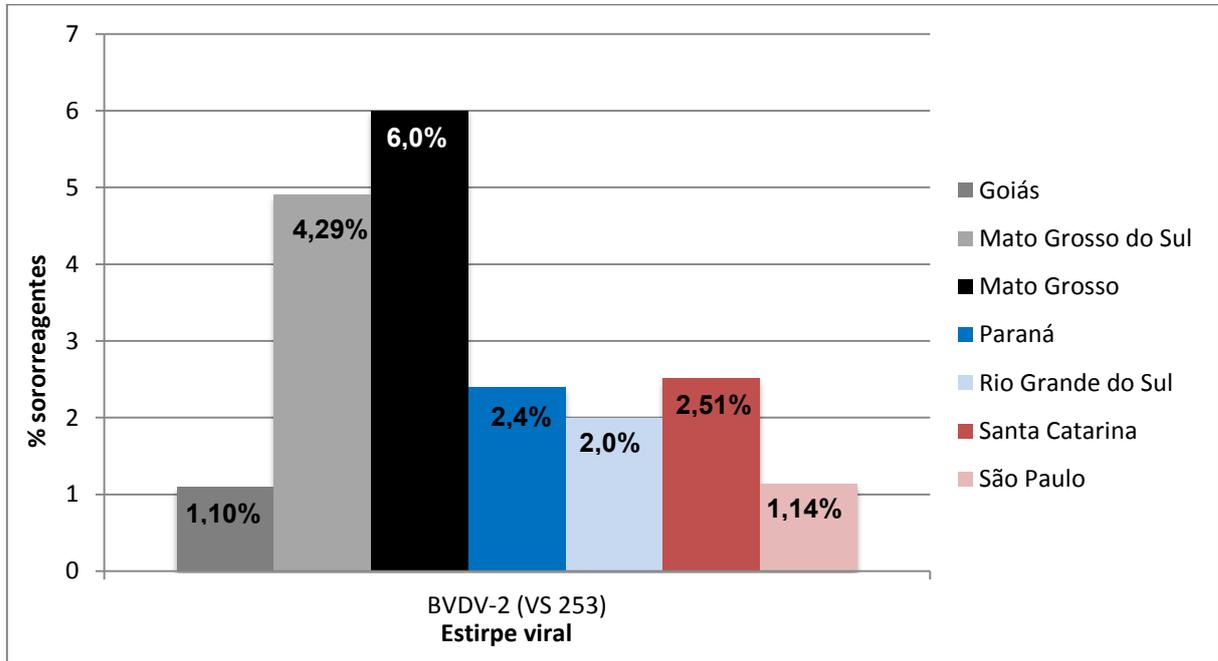


Figura 10. Representação gráfica das porcentagens de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, submetidas ao teste de VN para detecção de anticorpos anti-BVDV-2 (VS 253), de acordo com os estados de origem das 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

Não se observou diferença significativa entre os estados de origem e a prevalência de anticorpos contra BVDV-2 de acordo com teste exato de Fisher.

5.6. Resultados dos títulos encontrados

Conforme esperado, foram observadas variações nos títulos das amostras dentro da mesma propriedade, sendo o maior título encontrado de 80. As maiores amplitudes encontradas nos títulos ocorreram nos animais dos municípios de Rodeio Bonito/RS, com variação de 10 a 40; Concórdia/SC, com variação de 20 a 80; Jaboticabal/SP, com variação de 10 a 40; Dourados/MS, com título de 40 e União do Oeste/SC, com título de 80 (Tabela 7).

Tabela 7. Número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes e as variações dos títulos de anticorpos no teste de VN contra o BVDV-1 (Singer), em amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| Propriedade | Município/estado | Nº total de animais/ propriedade | BVDV-1 (Singer) | |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--|
| | | | Reagentes/nº total suínos | Varição dos títulos de anticorpos |
| 1 | Siqueira Campos/PR ¹ | 255 | 3/255 | 10 a 20 |
| 2 | Rodeio Bonito/RS | 98 | 9/98 | 10 a 40 |
| 3 | Siqueira Campos/PR ¹ | 104 | 2/104 | 10 |
| 4 | Guariba/SP | 49 | 1/49 | 20 |
| 5 | Cristais Paulista/SP | 27 | 0/27 | 0 |
| 6 | Colina/SP | 120 | 2/120 | 10 |
| 7 | Concórdia/SC | 104 | 2/104 | 20 a 80 |
| 8 | Rio Verde/GO ² | 61 | 2/61 | 10 |
| 9 | Jaboticabal/SP ³ | 64 | 3/64 | 10 a 40 |
| 10 | Jaboticabal/SP ³ | 31 | 0/31 | 0 |
| 11 | Saudades/SC ⁴ | 128 | 5/128 | 10 a 20 |
| 12 | Vicentina/MS | 50 | 0/50 | 0 |
| 13 | Laranjeiras do Sul/PR | 30 | 4/30 | 10 a 20 |
| 14 | Campo Grande/MS | 30 | 1/30 | 20 |
| 15 | Nova Erechim/SC | 30 | 2/30 | 10 a 20 |
| 16 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 | 1/30 | 20 |
| 17 | Ipuã/SP | 31 | 0/31 | 0 |
| 18 | Dourados/MS | 30 | 1/30 | 40 |
| 19 | Iomerê/SC | 30 | 1/30 | 10 |
| 20 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 | 1/30 | 20 |
| 21 | Primavera do Leste/MT | 30 | 5/30 | 10 a 20 |
| 22 | Pinhalzinho/SC ⁶ | 30 | 0/30 | 0 |
| 23 | União do Oeste/SC | 30 | 1/30 | 80 |
| 24 | Salto Veloso/SC | 30 | 0/30 | 0 |
| 25 | Rio Verde/GO ² | 30 | 1/30 | 10 |
| 26 | Pinhalzinho/SC ⁶ | 27 | 2/27 | 20 |
| 27 | Espigão Alto do Iguaçu/PR | 29 | 0/29 | 0 |
| 28 | Saudades/SC ⁴ | 29 | 2/29 | 20 |
| 29 | Chapecó/SC | 30 | 0/30 | 0 |
| 30 | Ponta Porã/MS | 30 | 0/30 | 0 |
| 31 | Monte Alto/SP | 28 | 0/28 | 0 |
| 32 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 | 0/30 | 0 |
| 33 | Itiquira/MT | 20 | 0/20 | 0 |

^{1,2,3,4,5,6} Números iguais indicam mesmo município de origem, porém propriedades diferentes.

Para o BVDV-2, também ocorreu variação dos títulos em amostras obtidas dentro da mesma propriedade. As maiores amplitudes encontradas nos títulos ocorreram em animais dos municípios de Rodeio Bonito/RS, com variação de 10 a 40; Dourados/MS, com variação de 10 a 40; Salto Veloso/SC, com variação de 20 a 80 e Ponta Porã/MS, com título de 40 (Tabela 8).

Tabela 8. Número de amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, e a variação dos títulos de anticorpos no teste de VN contra o BVDV-2 (VS 253), em amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| Rebanho | Município/estado | Nº total de animais/ lote | BVDV-2 (VS 253) | |
|---------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| | | | Reagentes/nº total suínos | Varição dos títulos de anticorpos |
| 1 | Siqueira Campos/PR ¹ | 255 | 7/255 | 10 a 20 |
| 2 | Rodeio Bonito/RS | 98 | 2/98 | 10 a 40 |
| 3 | Siqueira Campos/PR ¹ | 104 | 1/104 | 20 |
| 4 | Guariba/SP | 49 | 0/49 | 0 |
| 5 | Cristais Paulista/SP | 27 | 0/27 | 0 |
| 6 | Colina/SP | 120 | 2/120 | 10 |
| 7 | Concórdia/SC | 104 | 1/104 | 10 |
| 8 | Rio Verde/GO ² | 61 | 1/61 | 20 |
| 9 | Jaboticabal/SP ³ | 64 | 0/64 | 0 |
| 10 | Jaboticabal/SP ³ | 31 | 0/31 | 0 |
| 11 | Saudades/SC ⁴ | 128 | 1/128 | 20 |
| 12 | Vicentina/MS | 50 | 2/50 | 10 a 20 |
| 13 | Laranjeiras do Sul/PR | 30 | 2/30 | 10 a 20 |
| 14 | Campo Grande/MS | 30 | 1/30 | 20 |
| 15 | Nova Erechim/SC | 30 | 0/30 | 0 |
| 16 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 | 1/30 | 10 |
| 17 | Ipuã/SP | 31 | 2/31 | 10 |
| 18 | Dourados/MS | 30 | 2/30 | 10 a 40 |
| 19 | Iomerê/SC | 30 | 1/30 | 10 |
| 20 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 | 2/30 | 10 |
| 21 | Primavera do Leste/MT | 30 | 3/30 | 10 a 20 |
| 22 | Pinhalzinho/SC ⁶ | 30 | 2/30 | 10 a 20 |
| 23 | União do Oeste/SC | 30 | 1/30 | 10 |
| 24 | Salto Veloso/SC | 30 | 3/30 | 20 a 80 |
| 25 | Rio Verde/GO ² | 30 | 0/30 | 0 |
| 26 | Pinhalzinho/SC ⁶ | 27 | 2/27 | 10 |
| 27 | Espigão Alto do Iguaçu/PR | 29 | 0/29 | 0 |
| 28 | Saudades/SC ⁴ | 29 | 0/29 | 0 |
| 29 | Chapecó/SC | 30 | 0/30 | 0 |
| 30 | Ponta Porã/MS | 30 | 1/30 | 40 |
| 31 | Monte Alto/SP | 28 | 0/28 | 0 |
| 32 | Águas Frias/SC ⁵ | 30 | 0/30 | 0 |
| 33 | Itiquira/MT | 20 | 0/20 | 0 |

^{1,2,3,4,5,6} Números iguais indicam mesmo município de origem, porém propriedades diferentes.

encontrados nos diferentes testes, observou-se que há diferença significativa entre os títulos, de acordo com a dose utilizada, segundo o teste de Wilcoxon ($V = 394.5$, $p\text{-value} = 0.0007302$).

Para o genótipo 2, as GMT dos títulos de anticorpos foram maiores quando submetidas ao teste com 50 TCID₅₀, comparadas com 100 TCID₅₀; desse modo, a tendência dos títulos de anticorpos com 50 TCID₅₀ foi maior. Foi verificado que a mediana dos títulos virais testada com 100 TCID₅₀ foi de 10; já com 50 TCID₅₀, a mediana dos títulos virais foi de 20 (Figura 12).

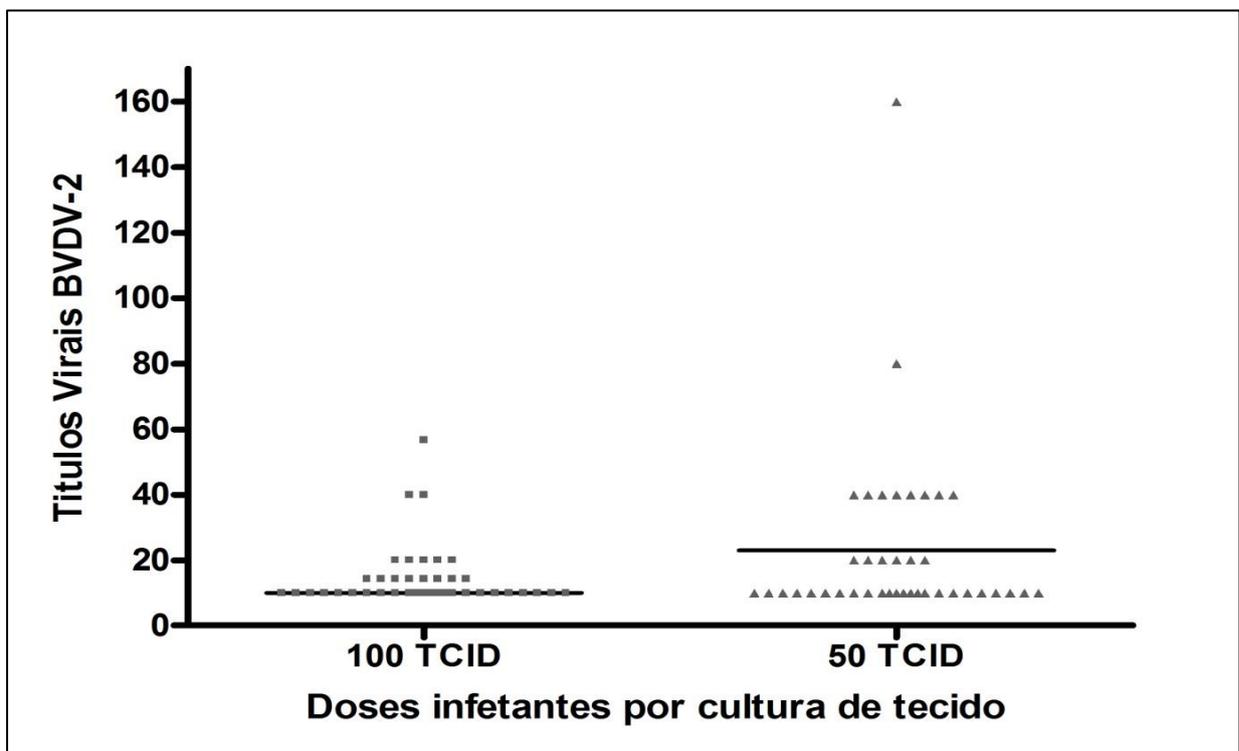


Figura 12. Representação gráfica da variação das médias geométricas dos títulos contra BVDV-2 (VS 253) encontrados em 40 amostras de soro sanguíneo de suínos sororreagentes, quando submetidos ao teste de VN com 100 TCID₅₀ e 50 TCID₅₀, em relação ao total dos 1705 amostras coletadas no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

Ao serem analisados os dados dicotômicos em relação aos testes de VN com 100 e 50 TCID₅₀ para BVDV-2, foi encontrada uma concordância muito boa pelo índice kappa 0,8468 (0,6437 a 1,0498) e teste binomial $p = 0,01563$, mostrando que as diferentes doses infectantes utilizadas não diferem significativamente quanto à detecção de amostras sororreagentes. Contudo, considerando a GMT dos títulos

encontrados nos diferentes testes, observou-se que há diferença significativa entre os títulos, de acordo com a dose utilizada, segundo teste de Wilcoxon ($V = 13$, $p\text{-value} = 8.5 \times 10^{-5}$ (0,00008567)).

5.8. Análise dos fatores de risco

5.8.1. BVDV-1

Para todas as 33 propriedades coletadas, foi realizado contato com os Serviços de Defesa Sanitária Animal, das respectivas Unidades Federativas e, com prévia autorização, conseguiu-se aplicar um questionário de caráter epidemiológico estruturado para cada propriedade (Tabela 9).

Tabela 9. Análise univariada dos fatores de risco para a presença de anticorpos contra o BVDV-1, no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| VARIÁVEIS | RR | IC (95%) | p |
|--|---------|--------------------|---------|
| Possui ruminantes | 2,7586 | 0,4965 a 15,3269 | 0,125 |
| Criação de bovinos leiteiros | 5,3846 | 0,8666 a 33,4592 | 0,0047* |
| Aquisição de bovinos nos últimos 6 meses | 1,6923 | 1,0308 a 2,7784 | 0,067* |
| Aquisição de caprinos/ovinos últimos 6 meses | 0,0 | - | 1,0 |
| Aquisição de suínos nos últimos 6 meses | 0,8 | 0,4793 a 1,3354 | 0,6776 |
| Bovinos em propriedades vizinhas (3,5km) | 1,3913 | 0,7075 a 2,7358 | 0,4334 |
| Caprinos/ovinos em propriedades vizinhas (3,5km) | 1,25 | 0,7489 a 2,0865 | 0,6776 |
| Problemas reprodutivos nos suínos (6 meses) | 0,7353 | 0,3497 a 1,5462 | 0,4196 |
| Problemas reprodutivos bovinos/caprinos/ovinos | 1,5625 | 1,0112 a 2,4143 | 0,2062 |
| Problemas reprodutivos propriedades vizinhas | 1,6 | 1,2234 a 2,0926 | 1,0 |
| Leite cru ou derivado alimentação dos suínos | 19,4444 | -14,1235 a 53,0124 | 0,4293 |
| Quem trata os suínos também trata os ruminantes | 1,2308 | 0,7451 a 2,033 | 0,7026 |
| Bovinos são vacinados para BVD | 1,2338 | 0,7433 a 2,0479 | 0,4861 |
| Os suínos são vacinados | 2,0 | 0,3957 a 10,1083 | 0,5381 |
| Aplica conceitos de biossegurança | 1,3103 | 0,4749 a 3,6155 | 0,61 |
| Possui cerca ao redor da granja | 2,7586 | 0,4965 a 15,3269 | 0,125 |
| Possui cinturão verde | 0,9766 | 0,5296 a 1,8009 | 1,0 |
| Funcionários tomam banho antes do trabalho | 1,0667 | 0,6116 a 1,8605 | 1,0 |
| Caminhões de fora entram na propriedade | 1,3333 | 0,5736 a 3,0992 | 0,6434 |
| Caminhões que transporta suínos/ração | 1,4063 | 0,8743 a 2,2619 | 0,3792 |
| Caminhões não são lavados e desinfetados | 0,9375 | 0,5375 a 1,6352 | 1,0 |
| Existe veículo de transporte interno na granja | 1,4154 | 0,8812 a 2,2733 | 0,2593 |
| Há livro de registro de visitas | 1,7059 | 1,2565 a 2,3161 | 0,2713 |
| Distância da rodovia da granja é > que 500 metros | 0,9375 | 0,5375 a 1,6352 | 1,0 |
| Distância rebanho suínos/abatedouro é > 3,5km | 0,6786 | 0,3766 a 1,2226 | 0,2728 |
| Lava e desinfeta instalações | 2,0 | 0,3957 a 10,1083 | 0,5381 |
| Tem quarentenário | 0,9467 | 0,5535 a 1,61194 | 1,0 |
| Embarcadouro/desembarcadouro junto à cerca | 0,7632 | 0,2766 a 2,1057 | 0,61 |
| Manejo todos dentro/todos fora | 1,0909 | 0,6527 a 1,8234 | 1,0 |
| Desinfecção de materiais e equipamentos | 1,8571 | 1,3010 a 2,6509 | 0,0319* |
| Ratos são vistos de dia | 0,9659 | 0,576 a 1,6199 | 1,0 |
| Ratos são vistos de noite | 0,9444 | 0,5003 a 1,783 | 1,0 |
| Presença de cães e gatos na granja | 0,8276 | 0,4393 a 1,559 | 1,0 |
| Têm muitas moscas | 1,0353 | 0,6173 a 1,7362 | 1,0 |
| Visitantes não respeitam vazio sanitário de 72 horas | 0,92 | 0,5112 a 1,6556 | 1,0 |

IC: intervalo de confiança; RR: risco relativo; p: teste exato de Fisher

* Variáveis consideradas para a análise de regressão logística

Nas variáveis, criação de bovinos leiteiros, aquisição de bovinos nos últimos 6 meses e possuir sistema de desinfecção para introdução de materiais e equipamentos na granja, consideradas como possíveis fatores de risco de infecção por BVDV-1, foi aplicada a análise de regressão logística multivariada, e não foi identificada associação entre os fatores analisados e o risco de infecção, considerando que 3 variáveis, obtiveram valores de $p > 0,05$ (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado da análise de regressão logística multivariada obtida com modelo incluindo as variáveis associadas com a infecção (com $p < 0,2$ na análise univariada) por BVDV-1 (Singer) em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| Variável | Odds ratio (OR) | Intervalo de confiança 95% da OR | P |
|--------------------------------------|------------------------|---|----------|
| Bovinos leiteiros | 6,0000 | 0,4778 a 75,3438 | 0,1652 |
| Aquisição de bovinos | 4,5000 | 0,5701 a 35,5187 | 0,1536 |
| Sistema desinfecção materiais | 1192945,3339 | 0,0000 a $>1.0^{12}$ | 0,9607 |

5.8.2. BVDV-2

Todas as variáveis foram confrontadas com a ocorrência ou não de animais sororreagentes ao BVDV-2. Foi realizada uma análise univariada dos dados, para identificação de possíveis fatores de risco com significância quanto à ocorrência da infecção. As variáveis com valor de $p < 0,2$ foram identificadas como possivelmente associadas ao risco da infecção: “aquisição de bovinos nos últimos 6 meses” ($p=0,0672$); “aplicação de conceitos de biossegurança” ($p=0,0121$); “caminhões não são lavados e desinfetados” ($p=0,0046$) e “visitantes não respeitam vazio sanitário de 72” ($p=0,1142$) (Tabela 11).

Tabela 11. Análise univariada dos fatores de risco para a presença de anticorpos contra o BVDV-2, no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| VARIÁVEIS | RR | IC (95%) | p |
|--|--------|------------------|---------|
| Possui ruminantes | 0,8276 | 0,4393 a 1,559 | 1,0 |
| Criação de bovinos leiteiros | 1,1442 | 0,5683 a 2,3039 | 0,6856 |
| Aquisição de bovinos nos últimos 6 meses | 1,6923 | 1,0308 a 2,7784 | 0,0672* |
| Aquisição de caprinos/ovinos últimos 6 meses | 0,0 | - | 1,0 |
| Aquisição de suínos nos últimos 6 meses | 1,36 | 0,6467 a 2,8599 | 0,4196 |
| Bovinos em propriedades vizinhas (3,5km) | 1,087 | 0,604 a 1,956 | 1,0 |
| Caprinos/ovinos em propriedades vizinhas (3,5km) | 0,7353 | 0,3497 a 1,5462 | 0,4196 |
| Problemas reprodutivos nos suínos (6 meses) | 0,7353 | 0,3497 a 1,5462 | 0,4196 |
| Problemas reprodutivos bovinos/caprinos/ovinos | 1,5625 | 1,0112 a 2,4143 | 0,2062 |
| Problemas reprodutivos propriedades vizinhas | 1,6 | 1,2234 a 2,0926 | 1,0 |
| Leite cru ou derivado alimentação dos suínos | 1,3333 | 0,82 a 2,1679 | 0,4293 |
| Quem trata os suínos também trata os ruminantes | 1,2308 | 0,7451 a 2,033 | 0,7026 |
| Bovinos são vacinados para BVD | 1,2338 | 0,7433 a 2,0479 | 0,4861 |
| Os suínos são vacinados | 2,0 | 0,3957 a 10,1083 | 0,5381 |
| Aplica conceitos de biossegurança | 0,00 | - | 0,0121* |
| Possui cerca ao redor da granja | 1,3103 | 0,4749 a 3,6155 | 0,61 |
| Possui cinturão verde | 0,9766 | 0,5296 a 1,8009 | 1,0 |
| Funcionários tomam banho antes do trabalho | 1,0667 | 0,6166 a 1,8605 | 1,0 |
| Caminhões de fora entram na propriedade | 1,3333 | 0,5736 a 3,0992 | 0,6334 |
| Caminhões que transporta suínos/ração | 1,0588 | 0,5608 a 1,999 | 1,0 |
| Caminhões não são lavados e desinfetados | 3,5625 | 1,0316 a 12,3031 | 0,0046* |
| Existe veículo de transporte interno na granja | 1,4154 | 0,8812 a 2,2733 | 0,2593 |
| Há livro de registro de visitas | 1,7059 | 1,2565 a 2,3161 | 0,2713 |
| Distância da rodovia da granja é > que 500 metros | 1,2 | 0,6269 a 2,2969 | 0,6905 |
| Distância rebanho suínos/abatedouro é > 3,5km | 0,8352 | 0,4833 a 1,4431 | 0,7157 |
| Lava e desinfeta instalações | 2,0 | 0,3957 a 10,1083 | 0,5381 |
| Tem quarentenário | 0,9467 | 0,5535 a 1,6194 | 1,0 |
| Embarcadouro/desembarcadouro junto à cerca | 0,7632 | 0,2766 a 2,1057 | 0,61 |
| Manejo todos dentro/todos fora | 1,32 | 0,7897 a 2,2063 | 0,4688 |
| Desinfecção de materiais e equipamentos | 1,4857 | 0,9502 a 2,3231 | 0,2233 |
| Ratos são vistos de dia | 0,7969 | 0,469 a 1,3538 | 0,4813 |
| Ratos são vistos de noite | 1,3333 | 0,5736 a 3,0992 | 0,6434 |
| Presença de cães e gatos na granja | 1,3103 | 0,4749 a 3,6155 | 0,61 |
| Têm muitas moscas | 1,2549 | 0,7386 a 2,132 | 0,4813 |
| Visitantes não respeitam vazio sanitário de 72 horas | 0,5412 | 0,2439 a 1,2008 | 0,1142* |

IC: intervalo de confiança; RR: risco relativo; p: teste exato de Fisher

* Variáveis consideradas para a análise de regressão logística

Para as 4 variáveis, consideradas como possíveis fatores de risco de infecção por BVDV-2, foi aplicada a análise de regressão logística univariada. O resultado demonstrou que a aplicação de conceitos de biossegurança, não tem associação com o risco de infecção ($p=9693$) (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado da análise de regressão logística univariada obtida com modelo incluindo as variáveis associadas com a infecção (com $p < 0,2$ na análise univariada) por BVDV-2 (VS 253) em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14.

| Variável | Odds ratio (OR) | Intervalo de confiança 95% da OR | P |
|---|------------------------|---|----------|
| Aquisição bovinos | 5,5 | 0,9625 a 31,4298 | 0,0552 |
| Biossegurança | 4522915,3856 | 0,0000 a $>1.0E12$ | 0,9693 |
| Caminhões não são lavados e desinfetados | 13,3 | 2,0814 a 84,9857 | 0,0062 |
| Visitantes não respeitam vazios sanitário 72 horas | 0,2353 | 0,0489 a 1,1316 | 0,0710 |

As variáveis “aquisição de bovinos nos últimos 6 meses”, “caminhões não são lavados e desinfetados” e “visitantes não respeitam vazios sanitário de 72 horas” tiveram valores de $p < 0,2$, sendo consideradas como possíveis fatores de risco de infecção por BVDV-2. Foi realizada uma nova análise de regressão logística multivariada, considerando as 3 variáveis.

Os resultados mostraram que apenas as variáveis “caminhões não são lavados e desinfetados” ($p=0,0077$) e “visitantes não respeitam vazios sanitário de 72 horas” ($p=0,0491$) foram associadas à possível ocorrência da infecção por BVDV-2 em suínos (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado da análise de regressão logística multivariada obtida com modelo incluindo as variáveis associadas com a infecção (com $p < 0,2$ na análise de regressão logística univariada) por BVDV-2 (VS 253) em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/lpuã, SP, 2013/14.

| Variável | Odds ratio (OR) | Intervalo de confiança 95% da OR | P |
|--|------------------------|---|----------|
| Aquisição de bovinos | 3,3115 | 0,2881 a 38,0650 | 0,3365 |
| Caminhões não são lavados e desinfetados | 30,9151 | 2,4739 a 386,3263 | 0,0077 |
| Visitantes não respeitam vazios sanitário de 72 horas | 0,0881 | 0,0078 a 0,9901 | 0,0491 |

5.9. Efeito citopático do BVDV-1 (estirpe Singer) e do BVDV-2 (estirpe VS 253)

Nas reações de VN, foram encontradas características próprias do efeito citopático do BVDV-1 (estirpe Singer) (Figuras 13).

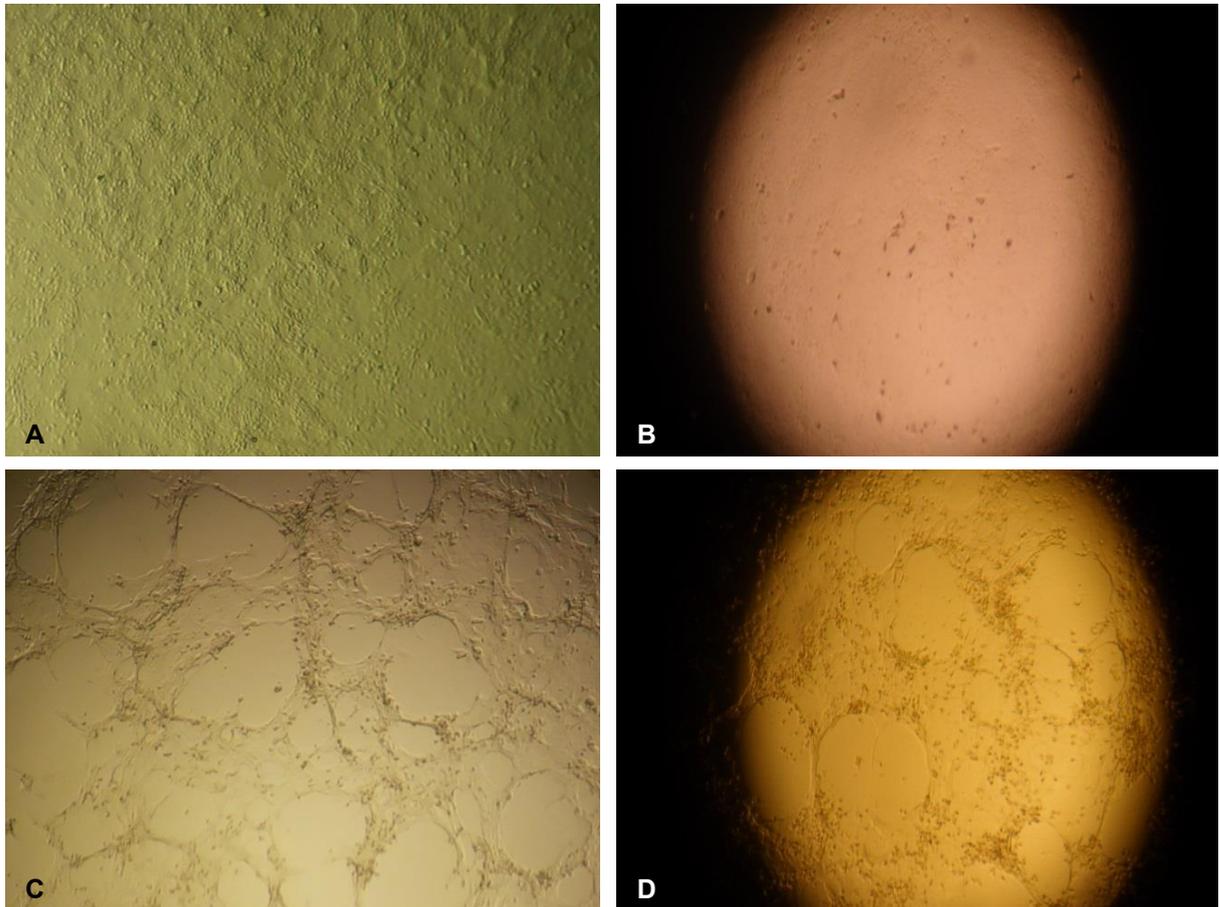


Figura 13. Foto de micrografia eletrônica do efeito citopático do BVDV-1 (estirpe Singer) em células MDBK. A: Controle negativo (aumento 40x) tapete celular íntegro. B: Sem efeito citopático. Neutralização positiva para BVDV-1 (aumento 40x). C e D: Efeito citopático (aumento 40x).

E características próprias do efeito citopático do BVDV-2 (estirpe VS 253) (Figura 14).

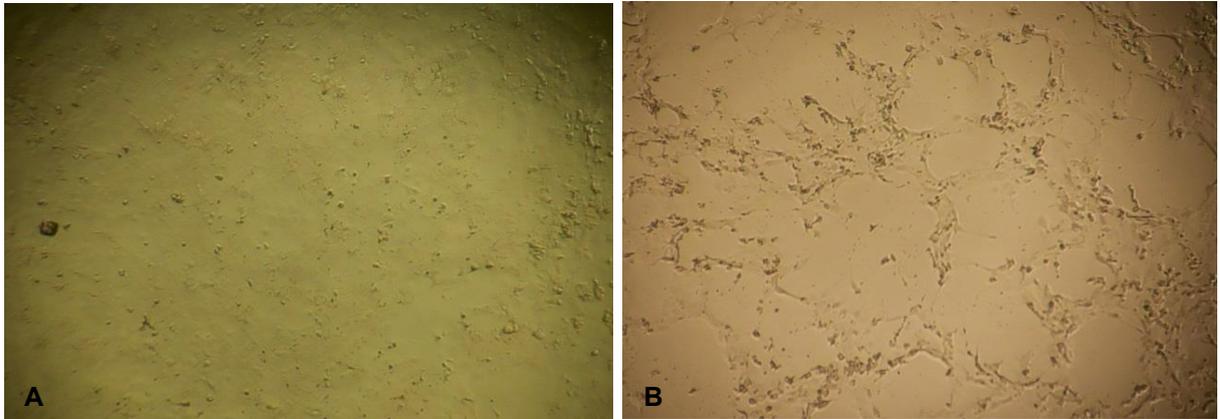


Figura 14. Foto de micrografia eletrônica do efeito citopático do BVDV-2 (estirpe VS 253) em células MDBK. A: Sem efeito citopático. Neutralização positiva para BVDV-2 (aumento 40x). B: Efeito citopático (aumento 40x).

6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PESTE SUÍNA CLÁSSICA (PSC)

As 51 amostras sororreagentes no teste de VN ao BVDV-1 foram submetidas à pesquisa de anticorpos específicos contra PSC utilizando um kit comercial de ELISA. Em todas as amostras, obteve-se porcentagem de inibição (pi) <40%, o que as classificou como negativas para anticorpos anti-PSC (Tabela 14).

Tabela 14. Porcentagem de inibição obtida no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o vírus da PSC, em amostras sororreagentes no teste de virusneutralização para anticorpos contra BVDV-1 (Singer), em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

(Continua)

| Nº da Amostra | Origem | DO450 | pi (%) | Resultado Final |
|---------------|--------------------|-------|--------|-----------------|
| 1 | Siqueira Campos/PR | 1.089 | -0.64 | Negativo |
| 2 | Siqueira Campos/PR | 1.084 | -0.18 | Negativo |
| 3 | Siqueira Campos/PR | 1.202 | -11.09 | Negativo |
| 4 | Rodeio Bonito/RS | 1.124 | -0.38 | Negativo |
| 5 | Rodeio Bonito/RS | 1.148 | 6.09 | Negativo |
| 6 | Rodeio Bonito/RS | 1.027 | 5.08 | Negativo |
| 7 | Rodeio Bonito/RS | 1.087 | -0.46 | Negativo |
| 8 | Rodeio Bonito/RS | 1.126 | -4.06 | Negativo |
| 9 | Rodeio Bonito/RS | 1.076 | 0.55 | Negativo |
| 10 | Rodeio Bonito/RS | 1.121 | -0.36 | Negativo |
| 11 | Rodeio Bonito/RS | 1.094 | -1.10 | Negativo |
| 12 | Rodeio Bonito/RS | 1.129 | -4.34 | Negativo |
| 13 | Siqueira Campos/PR | 1.088 | -0.55 | Negativo |
| 14 | Siqueira Campos/PR | 0.998 | 7.76 | Negativo |
| 15 | Guariba/SP | 1.027 | 5.08 | Negativo |
| 16 | Colina/SP | 1.045 | 3.41 | Negativo |
| 17 | Colina/SP | 1.096 | -1.29 | Negativo |
| 18 | Concórdia/SC | 0.996 | 7.94 | Negativo |
| 19 | Concórdia/SC | 1.050 | 2.95 | Negativo |
| 20 | Rio Verde/GO | 1.035 | 4.34 | Negativo |
| 21 | Rio Verde/GO | 1.002 | -0.55 | Negativo |
| 22 | Jaboticabal/SP | 1.004 | 7.20 | Negativo |
| 23 | Jaboticabal/SP | 1.069 | 1.20 | Negativo |
| 24 | Jaboticabal/SP | 1.089 | -0.64 | Negativo |
| 25 | Saudades/SC | 1.043 | 3.60 | Negativo |
| 26 | Saudades/SC | 1.136 | -4.99 | Negativo |

Tabela 14: (Continuação)

| Nº da Amostra | Origem | DO450 | pi (%) | Resultado Final |
|------------------|-----------------------|-------|--------|-----------------|
| 27 | Saudades/SC | 1.078 | 0.36 | Negativo |
| 28 | Saudades/SC | 1.051 | 2.86 | Negativo |
| 29 | Saudades/SC | 1.070 | 1.10 | Negativo |
| 30 | Laranjeiras do Sul/PR | 0.973 | 10.07 | Negativo |
| 31 | Laranjeiras do Sul/PR | 1.077 | 0.46 | Negativo |
| 32 | Laranjeiras do Sul/PR | 1.130 | -4.43 | Negativo |
| 33 | Laranjeiras do Sul/PR | 1.157 | -6.93 | Negativo |
| 34 | Campo Grande/MS | 1.101 | -1.75 | Negativo |
| 35 | Nova Erechim/SC | 1.358 | 0.25 | Negativo |
| 36 | Nova Erechim/SC | 1.354 | 0.55 | Negativo |
| 37 | Águas Frias/SC | 1.372 | -0.77 | Negativo |
| 38 | Dourados/MS | 1.314 | 3.48 | Negativo |
| 39 | Iomerê/SC | 1.308 | 3.92 | Negativo |
| 40 | Águas Frias/SC | 1.356 | 0.40 | Negativo |
| 41 | Primavera do Leste/MT | 1.350 | 8.84 | Negativo |
| 42 | Primavera do Leste/MT | 1.328 | 2.46 | Negativo |
| 43 | Primavera do Leste/MT | 1.371 | -0.69 | Negativo |
| 44 | Primavera do Leste/MT | 1.393 | -2.31 | Negativo |
| 45 | Primavera do Leste/MT | 1.396 | -2.53 | Negativo |
| 46 | União do Oeste/SC | 1.376 | -1.13 | Negativo |
| 47 | Rio Verde/GO | 1.352 | 0.69 | Negativo |
| 48 | Pinhalzinho/SP | 1.262 | 7.03 | Negativo |
| 49 | Pinhalzinho/SP | 1.242 | 8.77 | Negativo |
| 50 | Saudades/SC | 1.324 | 2.75 | Negativo |
| 51 | Saudades/SC | 1.294 | 4.95 | Negativo |
| Total: 51 | - | - | - | - |

DO450: Densidade ótica 450; pi: porcentagem de inibição.

As 40 amostras sororreagentes na VN para BVDV-2 também foram submetidas à pesquisa de anticorpos específicos para PSC utilizando um kit comercial de ELISA. Em todas as amostras, obteve-se $pi < 40\%$. O que significa que são negativas para anticorpos anti-PSC (Tabela 15).

Tabela 15. Porcentagem de inibição obtidas no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o vírus da PSC, em amostras sororreagentes no teste de virusneutralização para anticorpos contra BVDV-2 (VS 253), em amostras de soro sanguíneo de suínos abatidos no período de agosto de 2013 a junho de 2014, Guariba/Ipuã, SP, 2013/14.

| Nº da Amostra | Origem | DO450 | pi (%) | Resultado Final |
|------------------|-----------------------|-------|--------|-----------------|
| 1 | Siqueira Campos/PR | 0.980 | 7.28 | Negativo |
| 2 | Siqueira Campos/PR | 0.941 | 10.97 | Negativo |
| 3 | Siqueira Campos/PR | 1.043 | 1.32 | Negativo |
| 4 | Siqueira Campos/PR | 0.956 | 9.55 | Negativo |
| 5 | Siqueira Campos/PR | 0.981 | 7.19 | Negativo |
| 6 | Siqueira Campos/PR | 1.025 | 3.02 | Negativo |
| 7 | Siqueira Campos/PR | 0.966 | 8.60 | Negativo |
| 8 | Rodeio Bonito/RS | 0.952 | 9.93 | Negativo |
| 9 | Rodeio Bonito/RS | 0.968 | 8.42 | Negativo |
| 10 | Siqueira Campos/PR | 0.898 | 15.04 | Negativo |
| 11 | Colina/SP | 0.968 | 8.42 | Negativo |
| 12 | Colina/SP | 1.003 | 5.10 | Negativo |
| 13 | Concórdia/SC | 0.989 | 6.43 | Negativo |
| 14 | Rio Verde/GO | 0.944 | 10.69 | Negativo |
| 15 | Saudades/SC | 0.978 | 7.47 | Negativo |
| 16 | Vicentina/MS | 0.916 | 13.33 | Negativo |
| 17 | Vicentina/MS | 0.813 | 23.08 | Negativo |
| 18 | Laranjeiras do Sul/PR | 0.875 | 17.21 | Negativo |
| 19 | Laranjeiras do Sul/PR | 0.967 | 8.51 | Negativo |
| 20 | Campo Grande/MS | 0.983 | 7.00 | Negativo |
| 21 | Águas Frias/SC | 0.948 | 10.31 | Negativo |
| 22 | Ipuã/SP | 0.971 | 8.13 | Negativo |
| 23 | Ipuã/SP | 0.949 | 10.21 | Negativo |
| 24 | Dourados/MS | 0.819 | 22.51 | Negativo |
| 25 | Dourados/MS | 0.884 | 16.36 | Negativo |
| 26 | Iomerê/SC | 0.945 | 10.59 | Negativo |
| 27 | Águas Frias/SC | 0.965 | 8.70 | Negativo |
| 28 | Águas Frias/SC | 0.942 | 10.87 | Negativo |
| 29 | Primavera do Leste/MT | 0.933 | 11.73 | Negativo |
| 30 | Pinhalzinho/SP | 0.840 | 20.52 | Negativo |
| 31 | Pinhalzinho/SP | 0.937 | 11.35 | Negativo |
| 32 | União do Oeste/SC | 0.960 | 9.17 | Negativo |
| 33 | Salto Veloso/SC | 0.882 | 16.55 | Negativo |
| 34 | Salto Veloso/SC | 0.956 | 9.55 | Negativo |
| 35 | Salto Veloso/SC | 0.889 | 15.89 | Negativo |
| 36 | Pinhalzinho/SP | 0.828 | 21.66 | Negativo |
| 37 | Pinhalzinho/SP | 0.853 | 19.29 | Negativo |
| 38 | Ponta Porã/MS | 0.936 | 11.44 | Negativo |
| 39 | Primavera do Leste/MT | 0.995 | 5.86 | Negativo |
| 40 | Primavera do Leste/MT | 0.922 | 12.77 | Negativo |
| Total: 40 | - | - | - | - |

DO450: Densidade ótica 450; pi: porcentagem de inibição.

7. DISCUSSÃO

A prevalência de 5,34% (91/1705) de amostras sororreagentes de suínos ao BVDV 1 e 2 no teste de VN detectado neste estudo foi baixa, como encontrado em estudos de outros países (HOLM JENSEN, 1985; LOKEN et al., 1991; GRAHAM et al., 2001; LOEFFEN et al., 2009) .

A baixa prevalência de anticorpos contra BVDV pode estar associada à população estudada. Considerando que os animais eram provenientes de criação intensiva de suínos que adotava medidas de biossegurança, e este procedimento pode reduzir ou eliminar a presença de alguns agentes infecciosos. Loeffen et al. (2009) e O'Sullivan et al. (2011) atribuíram a baixa prevalência de BVDV em rebanhos suínos nas regiões que estudaram à alta especialização da agropecuária, em que o contato interespecies foi reduzido com a opção de uma única criação zootécnica na propriedade.

Os dados encontrados em estudos realizados em outros países corroboram os resultados desta pesquisa pelo fato de a prevalência ser baixa. Loeffen et al. (2009) avaliaram 6020 amostras de soro obtidas de 616 granjas de reprodutores e 1890 amostras de soro de 189 granjas de terminação para determinar a soroprevalência de BVDV-1 por meio do ELISA. O estudo constatou uma prevalência nas granjas de terminação de 0,42% nos suínos e 3,2% para rebanho e, para categoria de porcas, foi de 2,5% para as porcas e 11% em rebanhos. O presente estudo demonstrou uma diferença aproximadamente seis vezes superior na prevalência de amostras sororreagentes em animais de terminação (3,0%) quando comparado com os resultados do estudo de Loeffen et al. (2009) (0.42%). Este fato pode ser explicado pela diferença na sensibilidade nas técnicas utilizadas (ELISA/VN) e pelo nível de biossegurança distinto nas granjas estudadas.

Na China, 551 amostras de suínos com sinais clínicos como diarreia, abortamento e morte de leitões, entre 2007 e 2010, foram submetidas à técnica de Nested RT-PCR, e os resultados demonstraram uma prevalência de 23,1% em 2007; 27,7% em 2008; 33,6% em 2009 e 23,6% em 2010 mostrando uma alta prevalência da infecção de BVDV-1 (DENG et al., 2012b). Essas prevalências são altas, se comparadas às encontradas neste estudo. Amostras provenientes de

animais com sinais clínicos reprodutivos foi o fator que pode ter interferido nos resultados para os animais chineses coletados. Deng et al. (2012b) associaram a prevalência encontrada de forma conectada com a prevalência do BVDV nos rebanhos bovinos, com a ampla utilização de vacinas vivas para PSC, produzidas com a utilização dos soros de bovinos dos mesmos rebanhos chineses, situação que oferece risco de transmissão de BVDV por utilização de vacinas contaminadas. Fan Xue-zheng et al. (2010) testaram os lotes de vacinas vivas contra PSC utilizadas na China e confirmaram 5 amostras contaminadas com BVDV das 23 coletadas para os testes. No Brasil, não ocorre vacinação contra PSC nas áreas coletadas neste estudo, eliminando o possível risco de infecção pelo BVDV por meio das vacinas contra PSC. O risco da infecção por meio do uso de vacinas é quase inexistente, pois não ocorre o uso de vacinas atenuadas na suinocultura nacional.

Em relação a outros países, como Áustria, Alemanha e Holanda, as pesquisas com suínos indicam uma maior frequência de animais sororreagentes (LIESS; MOENNING, 1990; O'CONNOR et al., 1991; TERPSTRA; WENSVOORT, 1991). Em rebanhos suínos da Noruega, Irlanda e Dinamarca, os resultados encontrados indicam que a soroprevalência de BVDV (LOKEN et al., 1991; GRAHAM et al., 2001; HOLM JENSEN, 1985) foi semelhante àquelas do presente estudo. Já em estudo realizado com rebanho-sentinela de suínos no estado de Ontario, Canadá, não foi identificado animal algum positivo para BVDV (O'SULLIVAN et al., 2011).

A maior dificuldade para relacionar os dados encontrados foi a falta de informação sobre a ocorrência de anticorpos contra BVDV em suínos no Brasil, e as diferentes informações referentes a outros países, como tipo de exploração, idade dos animais estudados e métodos de diagnóstico empregados nos estudos.

No Brasil, não há relatos da ocorrência de anticorpos contra BVDV em suínos, o que torna este trabalho inédito. Ao mesmo tempo, encontra-se dificuldade para uma discussão e comparação se forem considerados municípios e estados de origem. Pode ser verificado que não ocorreu diferença significativa entre os municípios e quanto à proporção de sororreagentes a ambos os genótipos. Quando se verificam as informações dos questionários, a maior parte dos lotes foi coletada de propriedades que recebem animais de empresas integradoras, ou seja, onde as

medidas de biossegurança exigidas dos proprietários são semelhantes. Esse fator pode estar associado à não diferença entre a proporção de sororreagentes e os municípios de origem. Então, pode-se considerar que a repetição deste estudo poderá apresentar resultados semelhantes.

Animais dos estados de Mato Grosso e Rio Grande do Sul apresentaram maior risco de infecção pelo BVDV-1 quando comparados com os demais estados. Uma possível explicação ao risco da ocorrência da infecção no estado de Mato Grosso seria por comportar o maior rebanho bovino do país, com 28.740.802 de cabeças, essa afirmação é endossada, visto que as propriedades do estado de Mato Grosso também possuíam ruminantes. O estado do Rio Grande do Sul se destaca entre os estados estudados como o segundo maior rebanho de vacas ordenhadas, com 1.516.689 de cabeças (IBGE, 2012), mostrando a relação entre a possível ocorrência da infecção e a proximidade interespecíes, informação embasada na condição que a propriedade do estado do Rio Grande do Sul também possuía bovinos leiteiros.

Como não há relatos da soroprevalência de BVDV em suínos no Brasil, foram consideradas as ocorrências do mesmo vírus na espécie bovina. No estado de Mato Grosso, foram encontrados trabalhos sobre a ocorrência de contra BVDV; e que demonstraram que na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul (MS), houve uma ocorrência de anticorpos neutralizantes de 43,6% (PELLEGRIN et al., 1997), ainda no estado de MS, foi observada ocorrência de 83,67% de sororreagentes (RICHTZEINHAIN et al., 1999). Considerando o estado de Goiás (GO), foram encontradas 54,11% de amostras sororreagentes no estudo realizado por Guimarães et al. (2001) e 64%, segundo Alfaia et al. 2004 e Brito, 2010.

No estado de São Paulo (SP), diversos estudos demonstraram a ocorrência de anticorpos contra BVDV. Langoni et al. (1995) encontraram 39,5%; 78% para Richtzeinhain et al. (1997) e 78% para estes mesmos autores (1999) e 16,2% para Pituco et al. (1997). Estudo realizado pelo Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico encontrou 47,7% (PITUCO; DEL FAVA, 1998). Dias e Samara (2003) encontraram 57,18% na região Nordeste do estado.

No estado do Paraná, foram encontradas ocorrências de anticorpos contra BVDV. Richtzeinhain et al. (1999) encontraram 67,42% e Médici et al. (2000)

encontraram 73,47%. Não foram encontrados trabalhos com a ocorrência de anticorpos contra BVDV no estado de Santa Catarina. No estado do Rio Grande do Sul, Krahl et al. (1997) determinaram ocorrência de 23,4% contra BVDV; Canal et al. (1998) encontraram 56% e Richtzeinhain et al (1999) 72,95%. Flores et al. (2000) pesquisaram a ocorrência de bovinos sororreagentes ao BVDV-1 e ao BVDV-2, em 1134 amostras de soro sanguíneo; 280 (24,7%) foram sororreagentes ao BVDV; dessas amostras, 28 (2,5%) reagiram ao BVDV-1; 37 (3,3%) reagiram ao BVDV-2 e 215 (18,96%) foram sororreagentes a ambos os genótipos.

Alguns estudos epidemiológicos determinaram que os bovinos são os principais hospedeiros do BVDV, e a principal fonte de infecção para os suínos (VANNIER; ALBINA, 1999; RIDPATH, 2010). Assim, o contato com bovinos em uma mesma propriedade é considerado a principal causa de transmissão de BVDV em suínos (VANNIER; ALBINA, 1999; LIESS; MOENNIG, 1990). Segundo Deng et al. (2012b), a prevalência do BVDV em rebanhos suínos está intimamente ligada à prevalência da enfermidade em rebanhos bovinos.

Em todos os estados brasileiros que tiveram suínos sororreagentes, há uma alta prevalência de anticorpos contra BVDV em bovinos, demonstrando que a infecção está amplamente distribuída e, conseqüentemente, a circulação viral acompanha essas prevalências encontradas, possibilitando a infecção de espécies susceptíveis, como é o caso dos suínos, principalmente onde as criações são muito próximas e facilitam a infecção interespecies ativa dentro de uma mesma propriedade. Com efeito, havendo a presença de bovinos infectados pelo BVDV, potencializar-se-á também o risco de transmissão por meio de fômites como caminhões, pessoas, alimentos, água, dentre outros.

A técnica utilizada no trabalho (VN) é sensível e específica e é considerada padrão-ouro para o diagnóstico sorológico da infecção por BVDV (EDWARDS, 1990; HOWARD, 1990; SANDVIK, 1999; OIE, 2012). Porém, o inconveniente é que os resultados demandam tempo, porque esta é uma técnica laboriosa que exige estrutura com cultivo-celular (SANDVIK, 1999).

Os resultados encontrados demonstraram que a VN foi altamente específica contra os genótipos utilizados, apenas 0,1% das amostras apresentou reatividade cruzada nos dois genótipos e não houve reatividade alguma contra PSC. Segundo a

OIE (2012), a VN é altamente específica e pode ser utilizada para mensurar e identificar anticorpos neutralizantes específicos. Pellerin et al. (1994) também observaram baixa reatividade sorológica cruzada entre BVDV-1 e BVDV-2. Flores et al. (2000) sugerem a realização da VN com utilização dos dois genótipos de isolados locais. Segundo os resultados encontrados, se exclusivamente o genótipo 1 tivesse sido utilizado nos testes, apenas 3,0% de amostras sororreagentes teriam sido detectadas contra 5,34%, quando utilizados os dois genótipos. De acordo com a OIE (2012), é importante a utilização dos dois genótipos, para evitar que números mais baixos de sororreagentes sejam detectados. Fulton et al. (1997) deixam claro que a especificidade da VN frente a baixos níveis de anticorpos contra o BVDV-1 ou contra o BVDV-2, pode interferir na detecção de amostras sororreagentes, quando utilizado apenas um dos genótipos.

Com os resultados obtidos, foi verificado que, em relação à ecopatologia dos vírus, apenas duas amostras 0,1% (2/1705) revelaram neutralização positiva para os dois genótipos; os outros 2,9% (49/1705) reagiram com neutralização apenas ao BVDV-1 e 2,2% (38/1705) tiveram neutralização positiva contra o BVDV-2. Esses resultados demonstram a alta variabilidade genética e antigênica dos vírus circulantes. Essa alta diversidade antigênica do BVDV pode interferir diretamente no diagnóstico sorológico, principalmente pelo fato da baixa reatividade sorológica cruzada entre os genótipos 1 e 2 (EDWARDS; PATON, 1995; BROCK, 1995).

Segundo Botton et al. (1998), alguns isolados apresentam uma baixa reatividade sorológica cruzada contra as estirpes vacinais norte-americanas Singer, NADL e Oregon. De acordo com Flores et al. (2000), amostras brasileiras de BVDV, principalmente as do genótipo 2, apresentam reatividade sorológica muito baixa em relação às estirpes vacinais do BVDV. Os resultados encontrados são muito importantes, pois provavelmente demonstram que os rebanhos foram infectados especificamente pelo BVDV-1 ou pelo BVDV-2, partindo do pressuposto de que no Brasil, os dois genótipos do BVDV já foram identificados (BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 2005; CORTEZ et al., 2006).

Os títulos de anticorpos neutralizantes encontrados para BVDV foi baixo independente do genótipo utilizado no teste de VN. Considerando as GMT encontradas, 48,35% (44/91) obtiveram títulos de (10), 27,47% (25/91) títulos de

(14), 17,58% (16/91) títulos de (20), 1,1% (1/91) título de (28), 3,3% (3/91) títulos de (40), 1,1% (1/91) título de (56) e 1,1% (1/91) título de (80). Loeffen et al. (2009) encontraram títulos de anticorpos neutralizantes para BVDV em amostras de suínos de terminação. Contra a estirpe Osloss, (8/1890) amostras obtiveram títulos de anticorpos, com variação entre (15 a 3840), das oito amostras, cinco delas também obtiveram títulos de anticorpos contra a estirpe NADL, com variação de (30 a 160). Em comparação, Loeffen et al. (2009) encontraram títulos de anticorpos relativamente superiores ao deste estudo, contudo os valores dos títulos de anticorpos encontrados permanecem entre a variação citada. Graham et al. (2001) encontraram 1 amostra de suíno com título de anticorpo de (64), título baixo e muito parecido com os títulos de anticorpos encontrados.

Um estudo e um experimento paralelos a este estudo foram conduzidos. No estudo, foi pesquisada a presença de anticorpos neutralizantes contra BVDV em amostras de suínos de subsistência, foram encontradas (17/320) amostras sororreagentes, com variação de títulos de anticorpos de (10 a 160). No experimento, leitões foram infectados com BVDV-1 (estirpe Singer), a soroconversão ocorreu no dia 26 pós-infecção, os dois animais infectados apresentaram títulos de anticorpos com variação de (40 a 160), dados não publicados. Os títulos encontrados no estudo e no experimento apresentam variação de títulos de anticorpos similares a este estudo. Uma explicação para a detecção de títulos baixos de anticorpos possa ser uma infecção recente, onde a curva padrão da produção de anticorpos apresentada por animais infectados esteja no início.

Quando foram testadas as amostras sororreagentes com 100 TCID₅₀ frente à 50 TCID₅₀ contra o mesmo genótipo viral, não se encontraram diferenças significativas em relação à detecção de amostras sororreagentes e a dose infectante utilizadas, obtendo uma concordância muito boa pelo índice Kappa entre os testes com diferentes doses. Porém quando se compararam as GMT encontradas com as diferentes doses infectantes utilizadas entre um mesmo genótipo, foi observado que há diferença significativa pelo teste de Wilcoxon entre os valores dos títulos neutralizantes obtido com as doses utilizadas no teste. De forma descritiva, para o BVDV-1, o teste com 100 TCID₅₀ foi melhor, por detectar as mesmas amostras testadas com 50 TCID₅₀, porém as GMT encontradas foram maiores; já para o

genótipo 2, o teste de VN foi melhor quando utilizada 50 TCID₅₀, devido à detecção das mesmas amostras testadas com 100 TCID₅₀, porém as GMT foram maiores.

Alguns estudos já evidenciaram discrepâncias entre os resultados de VN contra os genótipos 1 e contra o 2, da mesma maneira com os respectivos títulos de anticorpos, em bovinos experimentalmente infectados ou bovinos vacinados (FULTON et al., 1997; JONES et al., 2001; VOGEL et al., 2002; LIMA et al., 2005).

Saliki e Dubovi (2004) descreveram que a discordância encontrada nos resultados no teste de VN pelos laboratórios, tem como principal fator as diferentes estirpes de BVDV empregadas. Outros fatores além das diferentes estirpes virais utilizadas, como as linhagens celulares, a dose infectante utilizada e o tempo de incubação, também geram discrepâncias nos resultados da VN. Esses fatores demonstram a falta de uniformização dos laboratórios na realização da técnica (CHASE et al., 2003; KAPIL et al., 2005).

Em relação ao BVDV-1, não foi atribuída associação significativa no teste de regressão logística a nenhum dos fatores de risco. Para a prevalência do BVDV-2, foi encontrada associação significativa no teste de regressão logística para os fatores “caminhões não são lavados e desinfetados” ($p=0,0077$) e “visitantes não respeitam vazios sanitários de 72 horas” ($p=0,0491$). Diferente do que se encontrou, Loeffen et al. (2009) em um estudo na Holanda, identificaram como possíveis fatores de risco associados à infecção pelo BVDV em suínos a presença de bovino e suíno na mesma propriedade e uma alta densidade de ovinos e/ou caprinos em um raio de três quilômetros.

Estudo recente demonstrou que algumas doenças podem permanecer em um país por muito tempo sem serem detectadas e que a aplicação de medidas de biossegurança pode ser implementadas ou cumpridas tarde demais para evitar a disseminação por meio de fômites. No caso do surto do vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV) ocorrido nos Estados Unidos nos anos de 2013 e 2014, foram considerados os seguintes itens: caminhões contaminados a partir de um ponto de carregamento de suínos, contato entre o condutor do veículo com o ponto de carregamento e o contato do motorista com o ponto de descarregamento dos animais deveriam ser evitados. Mesmo parecendo medidas higiênicas sanitárias simples, a mobilização deveria partir de motoristas, produtores e proprietários de

unidades de distribuição de animais para que ocorresse a redução do risco de veiculação do patógeno e a implementação das medidas preventivas fosse eficaz (LOWE et al., 2014).

A não desinfecção dos veículos de transporte e o não cumprimento de vazio sanitário de 72 horas para os visitantes foram os fatores de risco associados à ocorrência da infecção por BVDV em suínos. Esses resultados encontrados estão relacionados aos fatores de risco atribuídos à disseminação do PEDV, demonstrando que medidas de biossegurança de simples aplicação não são empregadas ou cumpridas de forma adequada, favorecendo a ocorrência de infecções.

Como existe a possibilidade de reação cruzada de anticorpos contra BVDV e CSFV, todas as amostras sororreagentes ao BVDV neste estudo foram submetidas à pesquisa de anticorpos anti-PSC, mas nenhuma amostra foi identificada com reação positiva para anticorpos específicos contra PSC.

Estes resultados apontam a importância de estudar a infecção pelo BVDV em suínos, pois todos os animais sororreagentes deste estudo eram de estados da área livre de PSC e que executam vigilância epidemiológica. Entretanto, foi provada a existência de circulação de pestivírus. Deveras, é conhecida a reação cruzada entre BVDV e CSFV em testes sorológicos, como é o caso do teste de VN, assim há necessidade de conhecer a ocorrência de BVDV em suínos, para facilitar o direcionamento das interpretações em testes diagnósticos e evitar equívocos em situações de suspeita de focos de PSC.

Portanto, é fundamental que novos estudos de prevalência para BVDV em suínos sejam realizados, no âmbito de gerar mais informações epidemiológicas que possam ajudar na caracterização da infecção em suínos.

8. CONCLUSÕES

Foi encontrada baixa prevalência de 5,34% de amostras sororreagentes ao BVDV em suínos abatidos em matadouros-frigorífico. Observou-se a ocorrência de um número maior de animais sororreagentes ao BVDV-1 do que ao BVDV-2.

Os estados com maior percentual de animais sororreagentes ao BVDV-1 foram Mato Grosso com 10,00% e Rio Grande do Sul com 9,18%. Para o BVDV-2, os estados com maior percentual de animais sororreagentes foram Mato Grosso com 6,0% e Mato Grosso do Sul com 4,29%. Não foi detectada diferença estatística para a ocorrência entre municípios.

Não foram encontradas associações significativas entre a ocorrência de BVDV-1 e nenhum dos fatores de risco pesquisados. Entretanto, para o BVDV-2, foram encontradas associações significativas nos fatores: “caminhões não são lavados e desinfetados” e “visitantes não respeitam vazio sanitário de 72 horas”.

Os títulos encontrados contra o BVDV-1 no teste de VN com 100 TCID₅₀ foram maiores quando comparados ao teste das mesmas amostras com 50 TCID₅₀. Contudo, os títulos encontrados contra o BVDV-2 no teste de VN com 100 TCID₅₀ foram menores quando comparados ao teste das mesmas amostras com 50 TCID₅₀.

Em nenhuma amostra sororreagente ao BVDV foi detectado anticorpos específicos contra PSC.

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, Brazil. **Vírus Review Research**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 127, 2004.
- ARIAS, M.; ROMERO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. Peste Porcina Clásica (PPC). In: SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. (Ed. y Coord.). **Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas**. Madrid, 2003. Disponível em: <<http://sanidadanimal.info/cursos/curso/>>. Acesso em: 12 nov. 2014.
- BACHOFEN, C.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; STALDER, H.; PETERHANS, E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 258-267, 2010.
- BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Hobi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Invest.**, v.25, n.1, p. 6-15, 2013.
- BECHER, P.; RAMIREZ, R. A.; ORLICH, M.; ROSALES, S. C.; KÖNIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMIEIER, H.; THIEL, H. J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, Waltham, v. 311, n.1, p. 96-104, 2003.
- BOLIN, S. R.; MATTHEWA, P. J.; RIDPATH, J. F. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 3, n. 3, p. 199- 203, jul. 1991.
- BOTTON, S. A.; SILVA, A. M.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 11, p. 1429-1438, 1998.
- BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Portaria nº 201, de 15 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de mai. de 1998, Seção 1, p. 48.
- BRITO, W. M. E. D; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 39, n. 1, p. 7-19, 2010.

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

BROCK, K. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, v. 11, n. 3, p. 549-562, 1995.

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

CARBREY, E. A.; STEWART, W. C.; KRESSE, J. I.; SNYDER, M. L. Natural infection of pigs with bovine viral diarrhea virus and its differential diagnosis from hog cholera. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 169, p. 1217-1219, 1976.

CASTRUCCI, G.; TITOLI, F.; RANUCCI, S.; CASTRO PORTUGAL, F. L.; CILLI, V.; PI, B. Study of the experimental infection of pigs with bovine viral diarrhea (BVD) virus. **Bolletino dell'Istituto Sieroterapico Milanense**, Milan, v. 53, n. 5, p. 585-591, 1974.

CELEDÓN, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALFIO, R.; ASCENCIO, L.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 33, n. 2, p. 165-172, 2001.

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.

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

CORAPI, W. V. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, n. 4, p. 590-596, 1990.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; CASTRO, A. M. M. G. de; SOARES, R. M.; PINTO, A. M. V.; ALFIERI, A. A.; FLORES, E. F.; LEITE, R. C.; RIECHTZENHAIN, L. J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropedica, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006.

DAHLE, J.; PATZELT, T.; SCHAGEMANN, G.; LIESS, B. Antibody prevalence of hog cholera, bovine viral diarrhoea and Aujeszky's disease virus in wild boars in Northern Germany. **DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 100, n. 8, p. 301–340, 1993b.

DAHLE, J.; SCHAGEMANN, G.; MOENNIG, V.; LIESS, B. Clinical virological and serological findings after intranasal inoculation of pigs with bovine viral diarrhoea virus and subsequent intranasal challenge with hog cholera virus. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. [Journal of Veterinary Medicine. Series B.]**, Berlin, v. 40, n. 1, p. 46–54, 1993a.

DARBYSHIRE, J. H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. **Veterinary Record**, London, v. 72, p. 331, 1961.

DENG, Y.; SHAN, T.; TONG, W.; ZHENG, X.; GUO, Y.; ZHENG, H.; CAO, S.; WEN, X.; TONG, G. Genomic characterization of a bovine viral diarrhoea virus 1 isolate from swine. **Archives of Virology**, Wien, v. 159, n. 9, p. 2513–2517, 2014.

DENG, Y.; LIN, T.; SUN, C. Q.; ZHANG, H. B.; ZHANG, R.; LONG, J. X.; HUANG, L.; WEN, X. T.; CAO, S. J.; TONG, G. Z.; YUAN, S. S.; ZHENG, H. Expression of SD0803 strain from pig and preparation of antibodies E2 protein of bovine viral diarrhoea virus SD0803 strain. **Progress in Veterinary Medicine**, Beijing, v. 33, p. 31–35, 2012a.

DENG, Y.; SUN, C. Q.; CAO, S. J.; LIN, T.; YUAN, S. S.; ZHANG, H. B.; ZHAI, S. L.; HUANG, L.; SHAN, T. L.; ZHENG, H.; WEN, X. T.; TONG, G. Z. High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 159, n. 3-4, p. 490-493, 2012b.

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.

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

EDWARDS, S.; PATON, D. Antigenic differences among pestiviruses. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, v. 11, n. 3, p. 579-596, 1995.

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. 95-103, 1990.

FAN XUE-ZHENG, N. G. Y. -b.; WAN, G. Q.; XU, L.; SHEN, Q.-c. Detection of bovine viral diarrhoea virus as contaminant in classical swine fever virus live vaccine with RT-PCR. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, [S.l.], v. 46, p. 8–10, 2010.

FERNELIUS, A. L.; AMTOWER, W. C.; LAMBERT, G.; MCLURKIN, A. W.; MATTHEWS, P. J.; Bovine viral diarrhoeavirus in swine: characteristics of vírus recovered from naturally and experimentally infected swine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 37, n. 1, p. 13-20, 1973.

FINLAISON, D. S.; KING, K. R.; FROST, M. J.; KIRKLAND, P. D. Field and laboratory evidence that Bungowannah virus, a recently recognized pestivirus, is the causative agent of the porcine myocarditis syndrome (PMC). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3-4, p. 259–265, 2009.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. Flaviviridae. In: FLORES, E. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editoraufsm, 2007. p. 565-590.

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 diarréiviral 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 Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropedica, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FRÍAS LEPOUREAU, M. T.; PERCEDO ABREU, M. I. **Reconociendo la Peste Porcina Clásica**: manual ilustrado. Colaboração de Paula Naranjo Valdés e Sánchez Vizcaíno. Roma: FAO, 2003. 44 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/y4944s/y4944s00.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

FRÖLICH, K.; JUNG, S.; LUDWIG, A.; LIECKFELDT, D.; GIBERT, P.; GAUTHIER, D.; HARS, J. Detection of a Newly Described Pestivirus of Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica*) in France. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 41, n. 3, p. 606-610, 2005.

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 diarrhoea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, DC, v. 4, n. 3, p. 380-383, may 1997.

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

GRAHAM, D. A.; CALVERT, V.; GERMAN, A.; McCULLOUGH, S. J. Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. **Veterinary Record**, London, v. 148, n. 3, p. 69–72, 2001.

GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B., MOENNIG, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 113-118, 2003.

GROOMS, D. L.; BAKER, J. C.; AMES, T. R. Diseases caused by Bovine Virus Diarrhea Virus. In: SMITH, B. P. (Ed.). **Large animal internal medicine: diseases of horses, cattle, sheep, and goats**. 3 rd. St. Louis: Mosby, 2002.

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

HOLM JENSEN, M. Screening for neutralizing antibodies against hog cholera and/or bovine viral diarrhoea virus in Danish pigs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 26, n. 1, p. 72–80, 1985.

HOWARD, C. J. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)**, Paris, v. 9, n. 1, p. 95-103, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estados@**: Mato Grosso. [Rio de Janeiro], 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mt&tema=pecuaria2012>> Acesso em: 22 nov. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estados@**: Rio Grande do Sul. [Rio de Janeiro], 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=pecuaria2012>> Acesso em: 22 nov. 2014.

JONES, L.; VAN CAMPEN, H.; ZHI-CHANG, X.; SCHNACKEL, J. A. Comparison of neutralizing antibodies to type 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus from experimentally infected and vaccinated cattle. **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 diarrhoea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. Cap. 9, p. 157-170.

KIRKLAND, P. D.; FROST, M. J.; FINLAISON, D. S.; KING, K. R.; RIDPATH, J. F.; GU, X. Identification of a novel virus in pigs - Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 26–34, 2007.

KÜMMERER, B; M; MEYERS, G. Correlation between Point Mutations in NS2 and the Viability and Cytopathogenicity of Bovine Viral Diarrhoea Virus Strain Oregon Analyzed with an Infectious cDNA Clone. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, n. 1, p. 390-400, 2000.

- 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.
- 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.B 43.
- LEFORBAN, Y.; VANNIER, P.; CARIOLET, R. Protection of piglets born from ruminant pestivirus experimentally infected sows and their contact, to the challenge with hog cholera virus. **Annales de Recherches Vétérinaires**, London, v. 23, n. 1, p. 73–82, 1992.
- LISS, B.; MOENNING, V. Ruminant pestivirus infection in pigs. **Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)**, Paris, v. 9, n. 1, p. 151–161, 1990.
- LIMA, M.; VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 230-234, 2005.
- LOEFFEN, W. L. A.; VAN BEUNINGEN, A.; QUAK, S.; ELBERS, A. R. W.; Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3-4, p. 240-245. 2009.
- LOKEN, T.; KROGSRUD, J.; LARSEN, I. L. Pestivirus infections in Norway: serological investigations in cattle, sheep and pigs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 32, n. 1, p. 27–34, 1991.
- LOWE, J.; GAUGER, P.; HARMON, K.; ZHANG, J.; CONNOR, J.; YESKE, P.; LOULA, T.; LEVIS, I.; DUFRESNE, L.; MAIN, R. Role of Transportation in Spread of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 5, p. 872-874, 2014.
- LUNARDI, M.; HEADLEY, S. A.; LISBÔA, J. A. N.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: clinico pathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research in Veterinary Science**, London, v. 85, n. 3, p. 599-604, 2008.

LUZZAGO, C.; FRIGERIO, M.; PICCININI, R.; DAPRÀ, V.; ZECCONI, A. A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy. **Veterinary Journal**, London, v. 177, n. 2, p. 236-241, 2008.

MAINAR-JAIME, R. C.; HERRANZ, B. B.; ARIAS, P.; VAZQUEZ, R. Epidemiological pattern and risk factors associated with BVDV infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 63-73, 2001.

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

MOENNIG, V.; FLOEGEL-NIESMANN, G.; GREISER-WILKE, I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. **Veterinary Journal**, London, v. 165, n. 1, p. 11-20, 2003.

MOENNIG, V. Pestiviruses: a review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, p. 35-54, 1990.

MOSER, A. P. **Reação cruzada por diarreia viral bovina versus peste suína clássica**: estudo de caso. 2011. 67 f. Monografia (Especialização Gestão em Defesa Agropecuária: com ênfase em Defesa Sanitária Animal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NETTLETON, P. F. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. **Revue Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)**, Paris, v. 9, n. 1, p. 131-150, 1990.

O'CONNOR, M.; LENIHAN, P.; DILLON, P. Pestivirus antibodies in pigs in Ireland. **Veterinary Record**, London, v. 129, n. 12, p. 269, 1991.

O'SULLIVAN, T.; FRIENDSHIP, R.; CARMAN, S.; PEARL, D. L.; McEWEN, B.; DEWEY, C. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus neutralizing antibodies in finisher hogs in Ontario swine herds and targeted diagnostic testing of 2 suspect herds. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 52, n. 12, p. 1342-1344, 2011.

PATON, D. J.; DONE, S. H. Congenital infection of pigs with ruminant-type Pestiviruses. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 111, n. 2, p. 151-163, 1994.

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.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, Waltham, v. 203, n. 2, p. 260-268, 1994.

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

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

POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

QUICOZES, 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: Ciências Agrárias**, 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, n. 3, 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. Diarréia 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.

RICHTZENHAIN, L. J. Em busca de respostas. **Revista dos Criadores**, Santo André, v. 808, p. 40, 1997.

RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhoea Vírus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, v. 26, n. 1, p. 105-121, 2010.

ROEHE, P.; BRITO, W. D. Infecções por pestevírus de ruminantes. In: SOBESTIANSKY J.; BARCELLOS D. **Doenças dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Cànone Editorial, 2012. 959 p.

ROEHE, P. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; MUNHOZ, J. C. P. A. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no País. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Laboratório de Virologia, UFSM, 1998, p. 30-48.

RONECKER, S.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. **The Journal of General Virology**, London, v. 89, n. 9, p. 2114-2121, 2008.

SCHIRRMIEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal General Virology**, Reading, v. 85, pt. 12, p. 3647-3652, 2004.

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, 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.123-124, 1999.

SNOWDON, W. A.; FRENCH, E. L. The bovine mucosal disease-swine fever virus complex in pigs. **Australian Veterinary Journal**, Chichester, v. 44, n. 4, p. 179-184, 1968.

STÅHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; WADMAN, A. P.; BAULE, C.; AIUMLAMAI, S.; BELA'K, S. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus – implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, London, v. 38, n. 3, p. 517-523, 2007.

STALDER, H. P.; MEIER, P.; 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.

STEWART, W. C.; CARBREY, E. A.; JENNEY, E. W. Bovine viral diarrhoea infections in pigs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 159, p. 1556-1563, 1971.

TAO, J.; LIAO, J.; WANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; ZHU, G. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.165, n. 3-4, p. 185-189, 2013a.

TAO, J.; WANG, Y.; WANG, J.; WANG, J. Y.; ZHU, G. Q. Identification and genetic characterization of new bovine viral diarrhoea virus genotype 2 strains in pigs isolated in China. **Virus Genes**, New York, v. 46, n. 1, p. 81-87, 2013b.

TALAFHA, A. Q.; HIRCHE, S. M.; ABABNEH, M. M.; AL-MAJALI, A. M.; ABABNEH, M. M. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 41, n. 4, p. 499-506, 2008.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, T. G. Bovine viral diarrhoea virus infections in swine. **Tijdschr voor Diergeneeskunde**, Houten, v. 116, p. 943–948, 1991.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. **Research in Veterinary Science**, London, v. 45, n. 2, p. 137-142, 1988.

THIEL, H. J.; COLLETT, M. S.; GOULD, E. A.; HEINZ, F. X.; HOUGHTON, M.; MEYERS, G et al. *Flaviviridae*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus taxonomy: the eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 981-998.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2010. 556 p.

VAN AMSTEL, S.; KENNEDY, M. Bovine Viral Diarrhoea infections in new world camelids-a review. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 121-126, 2010.

VAN SCHAIK, G.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A. A. An economic model for on farm decision support of management to prevent infectious disease introduction into dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 51, n. 3-4, p. 289-305, 2001.

VANNIER, P.; ALBINA, E. Bovine viral diarrhoea and border disease. In: STRAW, B. D. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 8. ed. Ames: Blackwell Science, 1999.

VILCEK, S.; RIDPATH, J. F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J. L.; WARG, J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 187-193, 2005.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; MAYER, S. V.; QUADROS, V. L.; OLDONI, I. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 83-89, 2002.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEY, T. P.; KANEENE, J. B.; MAES, R. K. Comparison of type I and type II bovine viral diarrhoea virus infection in swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 119–123, 1999.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEY, T. P.; MAES, R. K. Experimental inoculation of pregnant swine with type I bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 51, n. 4, p. 191–193, 2004.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; DE KLUIJVER, E. P.; KRAGTEN, C.; WARNAAR, J. C. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against Hog Cholera Virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 9-20, nov. 1989.

WIERINGA-JELSMA, T.; QUAK, S.; LOEFFEN, W. L. A. Limited BVDV transmission and full protection against CSFV transmission in pigs experimentally infected with BVDV type 1b. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 26-36, 2006.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**: mammals birds and bees. [7 th. Paris, 2012. v. 2], chap. 2.4.8, p. 698-711. [Versão adotada em 2008]. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf> Acesso em: 22 nov. 2014

XU, X.; ZHANG, Q.; YU, X.; LIANG, L.; XIAO, H.; TU, C. Sequencing and comparative analysis of a pig bovine viral diarrhoea virus genome. **Virus Research**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 164–170, 2006.

ZAGHAWA, A. Prevalence of antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus and/or border disease virus in domestic ruminants. **Zentralblatt Veterinar Medizin**, Berlin, v. 45, n. 1-10, p. 345-351, 1998.

Anexo I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 07998/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Estudo epidemiológico de ocorrência e transmissão do vírus da diarreia viral bovina em suínos"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de maio de 2014.

Jaboticabal, 08 de maio de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

Anexo II – Questionário epidemiológico.

1. INFORMAÇÕES DA PROPRIEDADE

| | | | | | |
|-----------------------------|--------|----------|---------------------------------------|--------|---|
| Nome da propriedade: | | | Código da propriedade no estudo: | | |
| Nome do proprietário: | | | Telefone(s) de contato (DDD + número) | | |
| Endereço: | | | Município/UF | | |
| 1.8 Coordenadas geográficas | | | Altitude: | | Data da coleta das amostras ____/____/____ |
| Grau | Minuto | Segundos | Grau | Minuto | |
| Latitude (S) | | | Longitude (W) | | |

2. COMPOSIÇÃO DO REBANHO DE SUÍNOS

SUÍNOS:

Matrizes Cachaços Leitões maternidade Leitões cheche Leitões terminação Total:

3. INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

Possui RUMINANTE (bovino, caprino ou ovino) na propriedade: () NÃO () SIM - Discriminar a quantidade:

Bovinos Ovinos Caprinos

| Questionamentos | NÃO | SIM |
|--|-----|-----|
| Possui criação de bovinos leiteiros? | | |
| Fez aquisição de bovinos nos últimos 6 meses ? | | |
| Fez aquisição de caprinos ou ovinos nos últimos 6 meses ? | | |
| Fez aquisição de suínos nos últimos 6 meses ? | | |
| Existem bovinos em propriedades vizinhas (até 3km de raio)? | | |
| Existem caprinos e ovinos em propriedades vizinhas (até 3km de raio)? | | |
| Ocorreram problemas reprodutivos nos suínos nos últimos 6 meses? | | |
| Ocorreram problemas reprodutivos em bovinos, caprinos ou ovinos nos últimos 6 meses? | | |
| Sabe se ocorreram problemas reprodutivos em suínos e/ou em bovinos, caprinos e ovinos nas propriedades vizinhas? | | |
| Utiliza-se leite cru ou algum derivado de leite na alimentação dos suínos? | | |
| A pessoa que trata dos suínos também faz o trato de outros animais (ruminantes)? | | |
| Os bovinos são vacinados contra Diarreia Viral Bovina (BVD) ? | | |
| Os suínos são vacinados ? Quais vacinas: | | |
| Aplica conceitos de biossegurança na criação de suínos ?* | | |
| *Sem sim, completar quadro abaixo. | | |

4. INFORMAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

| | Não | Sim | | Não | Sim |
|---|-----|-----|--|-----|-----|
| Possui cerca ao redor da granja? | | | Lava e desinfeta instalações? | | |
| Possui cinturão verde? | | | Tem quarentenário? | | |
| Funcionários tomam banho antes do trabalho (vestiário próprio) e usam uniforme da granja? | | | Embarcadouro/ desembarcadouro de animais é junto à cerca periférica? | | |
| Caminhões de fora entram na propriedade? | | | Manejo todos dentro/ todos fora? | | |
| Caminhões de transporte de suínos transportam ração? | | | Possui sistema de desinfecção para introdução de materiais e equipamentos na granja? | | |
| Caminhões são lavados e desinfetados? | | | Ratos são vistos de dia? | | |
| Existe veículo de transporte interno na granja? | | | Ratos são vistos de noite? | | |
| Há livro de registro de visitas? | | | Presença de cães e gatos na granja? | | |
| Distância da rodovia onde há transporte de suínos é maior que 500 metros | | | Tem muitas moscas? | | |
| Distância de outro rebanho de suínos ou abatedouro é maior que 3,5 km | | | Visitantes respeitam vazão sanitário de 72 horas? | | |