

MONITORAMENTO DA INFECÇÃO NATURAL PELO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS BOVINOS¹

MONITORING OF NATURAL INFECTION BY BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) IN CATTLE HERDS

F. C. DIAS^{2*}, K. C. MÉDICI³, B. ALEXANDRINO², E. C. DIAS⁴,
A. A. ALFIERI³, S. I. SAMARA²

RESUMO

A infecção natural pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) foi monitorada em três rebanhos bovinos por meio de amostras de soro sanguíneo, obtidas em várias colheitas realizadas em cada rebanho, que foram submetidas ao teste de virusneutralização (VN) para o BVDV-1 e para o BVDV-2. As amostras não reagentes a pelo menos um dos genótipos e aquelas oriundas de bovinos com menos de seis meses de idade, reagentes ou não, foram analisadas pela reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) para a pesquisa do BVDV. Em dois rebanhos o vírus não foi detectado em nenhuma amostra e a quantidade de animais reagentes ao vírus no teste de VN, principalmente nos animais jovens, diminuiu à medida que as colheitas foram realizadas. No entanto, no terceiro rebanho, a infecção permaneceu durante o período monitorado, pois o BVDV foi detectado em dois animais persistentemente infectados (PI) e também em um animal transitoriamente infectado (TI). O sistema de criação, bem como o intenso trânsito de animais, foram favoráveis à permanência da infecção nesse último rebanho. A dinâmica da infecção pelo BVDV foi variável nos rebanhos analisados, destacando a provável eliminação espontânea do BVDV no rebanho 1 e os fatores de risco relacionados à transmissão do BVDV, como a freqüente aquisição de animais de diversas procedências pelo rebanho 4, assim como a provável hipótese da infecção do rebanho 17 ter originado a partir do rebanho vizinho.

PALAVRAS-CHAVE: Animal persistentemente infectado. Animal transitoriamente infectado. BVDV. Eliminação espontânea. Fatores de risco.

SUMMARY

The natural infection by bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was monitored in three cattle herds through blood serum samples, obtained in several harvests undertaken in each herd, and submitted to virusneutralization test (VN) against BVDV-1 and BVDV-2. The samples not reagent to at least one of the genotypes and also in those collected from calves of less than six month of age, the BVDV research was undertaken by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In two herds, the BVDV was not detected in any sample and the number of reagent animals to VN test, especially in young animals, decreased as the harvests were conducted. However, in third herd, the infection remained during the monitored period, because the BVDV was detected in two persistently infected animals (PI) and also in one transiently infected animal (TI). The cattle breeding systems, as well as the intense movement of animals, were favorable to the permanence of infection in this last herd. The dynamics of BVDV infection was variable in the analyzed herds, highlighting the probable self clearance of BVDV in the herd 1 and the risk factors related to transmission of BVDV, as the frequent purchase of animals from different origins for the herd 4, as well as the probable hypothesis of infection of herd 17 have originated from the neighboring herd.

KEY-WORDS: BVDV. Persistently infected animal. Risk factors. Self-clearance. Transiently infected animal.

¹ Projeto financiado pela FAPESP – processos 04/06800-0 e 06/59757-0

² Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, UNESP – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Vila Industrial, Jaboticabal-SP 14.884-900, Brasil. Tel: +55 16 3209 2646.

*Autor para correspondência: fabiocadi@yahoo.com.br

³ Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, CCA – UEL – Londrina/PR.

⁴ Universidade Federal de Lavras, UFLA – Lavras/MG.

INTRODUÇÃO

A diarreia viral bovina (BVD) é um conjunto de síndromes clínicas e assintomáticas associadas à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), um RNA-vírus pertencente ao gênero *Pestivirus* e à família *Flaviviridae* (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; BOLIN & RIDPATH, 1996). O BVDV é classificado em duas diferentes espécies (BVDV-1 e BVDV-2), sendo que ambos podem existir em dois diferentes biótipos, citopatogênico (CP) e não citopatogênico (NCP) (RIDPATH et al., 1994; TREMBLAY, 1996; RIDPATH, 2010).

Num rebanho infectado pelo BVDV existem duas potenciais fontes de infecção: o animal persistentemente infectado (PI) e o animal transitoriamente infectado (TI) (HOUE, 1994; LINDBERG & HOUE, 2005). A infecção persistente pode ser estabelecida tanto pelo BVDV-1 quanto pelo BVDV-2 (LIEBLER-TENORIO, 2005), resultante da infecção uterina pelo biótipo NCP do BVDV nos primeiros 125 dias de gestação (DEREGT & LOEWEN, 1995; GROOMS, 2004).

O animal PI é considerado a principal fonte de infecção do BVDV, pois elimina constantemente por toda a vida altos títulos do vírus em secreções e excreções (HOUE, 1995). Já o animal TI, ou seja, aquele que está na fase aguda da enfermidade, elimina o vírus por poucos dias ou eventualmente semanas (THURMOND, 2005), porém esse animal pode promover a permanência do vírus no rebanho na ausência de animais PI (MOERMAN, 1993).

Para o BVDV persistir num rebanho é necessário que um animal PI induza a geração de pelo menos outro animal PI (LINDBERG & HOUE, 2005). O BVDV pode permanecer num rebanho por várias gerações pela infecção transplacentária, desde que existam animais susceptíveis no início da gestação. Na ausência dessa condição, a circulação viral continua ocorrendo entre outros animais susceptíveis (TI) até o momento em que a infecção cessa nesses animais, pois os mesmos desenvolveram anticorpos e debelaram o vírus (MOERMAN et al., 1993; LINDBERG & ALENIUS, 1999; SANDVIK, 2004).

Após a infecção aguda e com a consequente eliminação do BVDV, os anticorpos permanecem por um longo período no soro sanguíneo (FREDRISKEN, 1999). Sendo assim, a presença da infecção pelo BVDV nos rebanhos pode ser evidenciada pela pesquisa de anticorpos nos animais jovens, também denominados sentinelas (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004). Considerando as variáveis presentes na dinâmica da infecção, este trabalho teve como objetivo monitorar a infecção natural pelo BVDV em três rebanhos bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Rebanhos

Para o estudo foram utilizados três rebanhos com a presença sugestiva do BVDV, de acordo com a

metodologia proposta por Pillars & Grooms (2002). Tal metodologia consistiu na pesquisa de anticorpos em amostras de sangue de cinco bezerros, com idade entre 6 e 12 meses, e não vacinados contra o BVDV. Desta maneira, um rebanho foi considerado reagente quando pelo menos três de cinco bezerros apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 128 frente a um genótipo do vírus, já que as amostras eram submetidas à virusneutralização (VN) tanto para o BVDV-1 quanto para o BVDV-2. Por outro lado, quando três de cinco bezerros apresentavam títulos menores do que 64 para ambos os genótipos, o rebanho era classificado como negativo. Os rebanhos monitorados, identificados respectivamente como rebanhos 1, 4 e 17, apresentaram pelo menos três de cinco amostras de soro sanguíneo de bovinos, com idade compreendida entre 6 e 12 meses, reagentes ao BVDV-1 ou ao BVDV-2 e com títulos de anticorpos superiores a 128.

O rebanho 1 estava localizado no município de Machado, Estado de Minas Gerais, apresentava regime de criação intensivo, era de exploração leiteira e na ocasião da primeira colheita possuía 336 animais da raça holandesa. O rebanho 4, localizado no município de Poço Fundo, Estado de Minas Gerais, caracterizava-se pela presença de animais mestiços em regime de criação extensiva para corte e na primeira colheita possuía 72 animais. O rebanho 17, cujo regime de criação era semi-intensivo e de exploração mista (leite e corte), possuía 94 animais da raça girolando, quando realizada a primeira colheita de sangue, e estava localizado no município de Pedregulho, Estado de São Paulo.

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

Amostras

Na primeira etapa, foram colhidas amostras de sangue pareadas, com intervalo de 30 dias entre as colheitas, de todos os animais existentes nos três rebanhos do estudo. Nas etapas posteriores foram realizadas as demais colheitas, porém em períodos distintos para cada rebanho, assim como o número e a categoria de animais analisados por rebanho (Tabela 1). No rebanho 1, foram realizadas cinco colheitas, durante um intervalo de 29 meses, totalizando 1.046 amostras colhidas; no rebanho 4, foram colhidas 249 amostras em quatro colheitas feitas num intervalo de 19 meses; e no rebanho 17, num intervalo de 17 meses, foram colhidas 216 amostras em três diferentes colheitas. Considerando todas as colheitas realizadas nos rebanhos pesquisados, foram obtidas no total 1.511 amostras de sangue.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos siliconizados “vacutainer” BD® e, após a colheita, foram centrifugadas a 1.080xg. De cada amostra, foram

obtidas duas alíquotas contendo 1,5mL de soro sanguíneo que foram assim destinadas: uma amostra para o teste contra o BVDV-1 e outra para o teste contra o BVDV-2. Até o momento do uso, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Teste sorológico

Todas as amostras foram submetidas ao teste de virusneutralização (VN) para a pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o BVDV-1 e contra o BVDV-2 (OIE, 2008). No teste de VN, foram utilizadas células epiteliais de rim bovino da linhagem “Madin Darby bovine kidney” (MDBK), mantidas em meio Eagle MEM (“Minimal Essential Medium”) Gibco®, suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) Cultiab® livre de *Pestivirus* e de anticorpos para o BVDV, e empregadas as cepas citopatogênicas (CP) do BVDV-1 (Singer) e do BVDV-2 (VS-253). As amostras de soro sanguíneo, antes de serem testadas, foram previamente inativadas a 56°C, por 30 minutos. Os testes de VN foram realizados em placas de microtitulação descartáveis de 96 cavidades TPP®, e o meio de manutenção Eagle-MEM Gibco®, utilizado para as diluições das amostras de soro, era acrescido de 1% de uma solução de penicilina (10.000UI mL⁻¹) e estreptomicina (10.000ug mL⁻¹) Gibco®.

Para cada amostra de soro testada, foram feitas duplicatas com diluições sucessivas entre 1:10 e 1:5.120. Depois de adicionada a suspensão viral contendo 100TCID₅₀ (50% “tissue culture infective doses”) do BVDV, as microplacas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Transcorridos 60 minutos, foi adicionada, em todas as cavidades das placas, uma suspensão de células MDBK contendo 300.000 células mL⁻¹ em meio de manutenção Eagle-MEM Gibco® com 10% de SFB Cultiab®. Em seguida, a placa foi novamente incubada em estufa, a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ por 96 horas. Na interpretação dos resultados, foram consideradas reagentes as amostras de soro sanguíneo que promoviam neutralização de 100 TCID₅₀ do BVDV a partir da diluição 1:10. As amostras reagentes na diluição 1:5.120 foram novamente testadas em duplicata até a diluição 1:20.480. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição em que foi verificada a neutralização viral, e o título final foi resultante da média geométrica dos títulos encontrados nas duplicatas – GMT (THRUSFIELD, 1986).

Pesquisa do BVDV

Nas amostras de soro sanguíneo não reagentes em pelo menos um dos testes de VN, contra o BVDV-1 ou contra o BVDV-2, e em todas as amostras, reagentes ou não, de bovinos com idade inferior a seis meses, o teste diagnóstico empregado para a pesquisa do BVDV foi a reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR), utilizando o protocolo descrito por Pilz et al. (2005), com algumas modificações.

A extração do RNA foi realizada segundo a metodologia preconizada por Boom et al. (1990), com a utilização de partículas de sílica e isotiocianato de

guanidina para a purificação de ácidos nucleicos. Na extração, foram utilizados 500µL do soro sanguíneo de cada amostra a ser testada e o RNA extraído foi eluído em água tratada com DEPC (dieltil pirocarbonato). A RT-PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 103 senso (5' TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC 3' – posição genômica 103-124) e 372 antissenso (5' ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3' – posição genômica 372-392), desenhados a partir da seqüência da região 5' não traduzida do genoma viral (5'UTR) do BVDV-1a NADL, que amplifica um produto de 290 pares de base (pb) e compartilha homologia máxima entre o BVDV-1 e o BVDV-2 (WEINSTOCK et al., 2001).

A RT foi realizada com 9µL da suspensão contendo o RNA e 20pmol do oligonucleotídeo iniciador antissenso 372, que foi desnaturado a 97°C por 5 minutos, e imediatamente colocada em banho de gelo por 5 minutos. Transcorrido esse período, em cada amostra foram adicionados 8µL do “mix” RT contendo água ultrapura autoclavada, PCR “buffer” 10x Invitrogen™ (200mM tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl), 0,25mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) Invitrogen™, 1,5mM de MgCl₂ Invitrogen™ e 60 unidades da enzima transcriptase reversa “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase” (M-MLV-RT) Invitrogen™, perfazendo assim um volume final de 20µL. Após a homogeneização, a síntese do cDNA foi realizada a 42°C por 30 minutos, seguido por uma etapa de 5 minutos a 95°C para a inativação da enzima M-MLV-RT.

A PCR foi realizada com 5µL do cDNA e 45µL do “mix” PCR constituído por água ultrapura autoclavada, PCR “buffer” 10x (200mM tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl), 0,25mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (senso 103 e antissenso 372) e 2,5 unidades da enzima “Taq Platinum DNA polymerase” Invitrogen™, totalizando um volume final de 50µL por amostra. As amostras de cDNA, juntamente com o “mix” PCR, foram homogeneizadas e a reação foi realizada em termociclador (PTC – 200, MJ Research Co. Water Town, Ma) numa etapa a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 59°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão), e um ciclo a 72°C por 7 minutos (extensão final).

Os produtos da PCR foram analisados pela eletroforese em gel de agarose a 2% Invitrogen™ com brometo de etídeo (0,5mg/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89mM tris; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA), sob voltagem constante (100V) e durante aproximadamente 60 minutos. Em cada gel foram reservadas duas canaletas para os controles positivos (BVDV-1 e BVDV-2), aplicados no mesmo volume das amostras, e uma canaleta para o controle negativo (água ultrapura autoclavada). Transcorrido esse período, o gel foi visualizado em um aparelho fotodocumentador BioRad® sob luz ultravioleta e fotodocumentado em sistema digital “Electrophoresis Documentation and Analysis System” 290 KODAK®.

RESULTADOS

Teste de VN

Os resultados dos testes de VN para o BVDV-1 e para o BVDV-2 realizados em 1.511 amostras de soro sanguíneo dos rebanhos 1, 4 e 17, obtidas nas diferentes colheitas e de acordo com as seguintes faixas etárias (0 a 6 meses, 6 a 12 meses, 12 a 24 meses e acima de 24 meses), estão apresentados respectivamente nas Tabelas 2, 3 e 4.

RT-PCR

A pesquisa do vírus pela RT-PCR foi realizada em 566 amostras de soro sanguíneo que não foram reagentes ao BVDV, ou não foram reagentes apenas a um dos genótipos do vírus, e em todos os bovinos com menos de seis meses de idade na ocasião da realização de cada colheita. Do total de amostras analisadas, 430 eram provenientes do rebanho 1, 36 do rebanho 4 e 100

do rebanho 17. O BVDV foi diagnosticado somente no rebanho 4.

Nas amostras pareadas de soro sanguíneo da 1ª e 2ª colheitas, o vírus foi detectado em dois animais com menos de seis meses de idade, respectivamente amostras 04/58A, 04/58B, 04/72A e 04/72B, caracterizando a ocorrência de dois animais PI (Figura 1 – Painel A). Esses mesmos animais não foram reagentes no teste de VN ao BVDV-1 e ao BVDV-2. No entanto, na 3ª colheita realizada no rebanho 4, o BVDV foi detectado em uma amostra de soro sanguíneo de um bovino com mais de 24 meses de idade (amostra 04/31C). Posteriormente, na amostra de soro sanguíneo obtida na 4ª colheita desse mesmo bovino, o vírus não foi detectado, mas títulos de anticorpos (2560) semelhantes contra o BVDV-1 e também contra o BVDV-2 foram detectados nessa mesma amostra, caracterizando assim um animal TI (Figura 1 – Painel B).

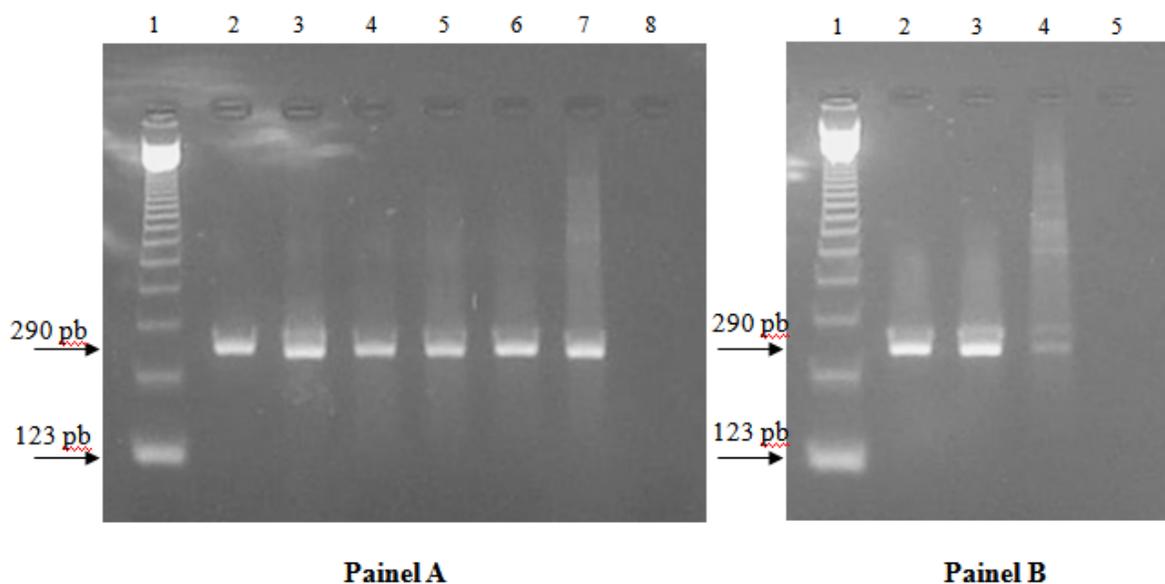


Figura 1 - Análise para a detecção do BVDV, por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, dos produtos (290 pb) amplificados pela RT-PCR em amostras pareadas de soro sanguíneo do rebanho 4.

Painel A - (1) Marcador de peso molecular DNA “ladder” 123 pb Invitrogen®; (2) estirpe citopatogênica BVDV-1 Singer; (3) estirpe citopatogênica BVDV-2 VS-253; (4) amostra 4/58 A; (5) amostra 4/58 B; (6) amostra 4/72 A; (7) amostra 4/72 B; (8) controle negativo - água ultrapura autoclavada.

Painel B - (1) Marcador de peso molecular DNA “ladder” 123 pb Invitrogen®; (2) estirpe citopatogênica BVDV-1 Singer; (3) estirpe citopatogênica BVDV-2 VS-253; (4) amostra 4/31 C; (5) controle negativo - água ultrapura autoclavada.

Tabela 1 - Total de colheitas de amostras de sangue realizadas para o monitoramento da infecção natural pelo BVDV nos rebanhos 1, 4 e 17 conforme o intervalo de tempo (meses), a categoria e o número de animais analisados.

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

(-) Colheita não realizada.

* Intervalo (meses) referentes à 1ª colheita.

** Rebanho vacinado após a 2ª colheita, sendo colhidas amostras apenas dos animais não vacinados 3ª colheita.

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

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

(-) colheitas não realizadas nas respectivas faixas etárias.

Tabela 3 -Resultado dos testes de VN para o BVDV-1 e para o BVDV-2 realizados nas amostras de soro sanguíneo do rebanho 4, de acordo com a faixa etária e nas diferentes colheitas.

Faixa etária	BVDV	VN	Colheitas			
			1ª	2ª	3ª	4ª
0-6 meses	BVDV 1	Número total de amostras	7	11	1	-
		Reagentes	5 (71,43%)	9 (81,82%)	0	-
		Não reagentes	2 (28,57%)	2 (18,18%)	1 (100%)	-
	BVDV 2	Reagentes	5 (71,43%)	9 (81,82%)	0	-
		Não reagentes	2 (28,57%)	2 (18,18%)	1 (100%)	-
6-12 meses	BVDV 1	Número total de amostras	4	4	14	1
		Reagentes	4 (100%)	4 (100%)	13 (92,86%)	1 (100%)
		Não reagentes	0	0	1 (7,14%)	0
	BVDV 2	Reagentes	4 (100%)	4 (100%)	13 (92,86%)	1 (100%)
		Não reagentes	0	0	1 (7,14%)	0
12-24 meses	BVDV 1	Número total de amostras	5	5	18	-
		Reagentes	5 (100%)	5 (100%)	17 (94,44%)	-
		Não reagentes	0	0	1 (5,56%)	-
	BVDV 2	Reagentes	5 (100%)	5 (100%)	17 (94,44%)	-
		Não reagentes	0	0	1 (5,56%)	-
> 24 meses	BVDV 1	Número total de amostras	56	56	59	8
		Reagentes	54 (96,43%)	55 (98,21%)	54 (91,53%)	3 (37,50%)
		Não reagentes	2 (3,57%)	1 (1,79%)	5 (8,47%)	5 (62,50%)
	BVDV 2	Reagentes	54 (96,43%)	55 (98,21%)	53 (89,83%)	3 (37,50%)
		Não reagentes	2 (3,57%)	1 (1,79%)	6 (10,17%)	5 (62,50%)
Total	BVDV 1	Número total de amostras	72	76	92	9
		Reagentes	68 (94,44%)	73 (96,05%)	84 (91,30%)	4 (44,44%)
		Não reagentes	4 (5,56%)	3 (3,95%)	8 (8,70%)	5 (55,56%)
	BVDV 2	Reagentes	68 (94,44%)	73 (96,05%)	83 (90,22%)	4 (44,44%)
		Não reagentes	4 (5,56%)	3 (3,95%)	9 (9,78%)	5 (55,56%)

(-) colheitas não realizadas nas respectivas faixas etárias.

Tabela 4 -Resultado dos testes de VN para o BVDV-1 e para o BVDV-2 realizados nas amostras de soro sanguíneo do rebanho 17, de acordo com a faixa etária e nas diferentes colheitas.

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

(-) colheitas não realizadas nas respectivas faixas etárias.

DISCUSSÃO

Durante o período do monitoramento, foram encontrados diferentes resultados entre os rebanhos analisados e pôde ser verificado que alguns fatores, como o sistema de criação dos rebanhos e a comercialização de animais, estiveram associados à presença da infecção pelo BVDV (QUINCOZES et al., 2007). Os resultados apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4 relacionam os testes de VN para o BVDV-1 e o BVDV-2, respectivamente dos rebanhos 1, 4 e 17. A análise realizada para os diferentes rebanhos considerou a infecção pelo BVDV mediante os resultados encontrados nos testes de VN para ambos os genótipos.

Analisando os rebanhos separadamente, no rebanho 1, a quantidade de animais reagentes ao BVDV nos testes de VN diminuiu à medida que as colheitas foram sendo realizadas (Tabela 2). Nas duas últimas colheitas não foram analisados todos os animais do rebanho, sendo pesquisados anticorpos apenas naqueles que indicariam se a transmissão do vírus estava ocorrendo dentro do rebanho, ou seja, nos animais sentinelas (PILLARS & GROOMS, 2002). Sendo assim, tais animais sentinelas consistiram naqueles com idade até 24 meses na 4ª colheita e até 12 meses na 5ª colheita. Por outro lado, dentre os animais jovens que foram reagentes ao BVDV em todas as colheitas, estavam incluídos também aqueles com menos de seis meses de idade e os anticorpos detectados poderiam ser de origem colostrar (DUBOVI, 1996).

Os resultados dos testes de VN, realizados em todas as amostras de soro sanguíneo obtidas em cinco colheitas no rebanho 1, forneceram evidências da ocorrência do fenômeno “self-clearance”, ou a eliminação espontânea do BVDV (LINDBERG & ALENIUS, 1999). A evidência da eliminação espontânea do vírus é reforçada principalmente pela não detecção da amplificação do genoma viral do BVDV na RT-PCR, realizada em 430 amostras de soro sanguíneo obtidas nas cinco colheitas que não tinham sido reagentes ao BVDV ou eram provenientes de bovinos com menos de seis meses de idade. Além disso, todos os animais com mais de seis meses de idade na ocasião das duas primeiras colheitas e que não foram reagentes ao BVDV, permanecerem não reagentes na 3ª colheita. Também tornaram-se não reagentes na 3ª colheita alguns animais com idade superior a seis meses que tinham sido reagentes nas duas primeiras colheitas e que haviam apresentado baixos títulos de anticorpos.

A proporção de animais não reagentes entre as colheitas realizadas foi mais evidente quando analisados os animais jovens nas faixas etárias de 6 a 12 meses e de 12 a 24 meses (Tabela 2). A quantidade de animais não reagentes nessas faixas etárias, principalmente nas três últimas colheitas, era bem maior em relação às duas primeiras. Especificamente na 5ª colheita, realizada apenas nos animais com até 12 meses de idade, nenhum animal foi reagente, sugerindo assim a ausência do BVDV no rebanho naquele momento (PILLARS & GROOMS, 2002).

Relacionando os resultados encontrados nos testes de VN realizados no rebanho 1 aos estágios da infecção pelo BVDV propostos por Houe (1995), sugeriu-se que possivelmente os animais PI teriam sido removidos próximo à ocasião das duas primeiras colheitas.

Nas amostras pareadas da 1ª e 2ª colheitas provenientes de animais incluídos na faixa etária entre 0 e 6 meses, na maioria delas, notaram-se títulos de anticorpos menores nas amostras referentes à 2ª colheita, inclusive com alguns animais já não mais reagentes, sugerindo assim que tratavam-se de anticorpos de origem colostrar. Porém, em oito animais, verificou-se que os títulos de anticorpos permaneceram constantes nas duas colheitas, sendo que em um deles o título de anticorpos foi quatro vezes maior na 2ª colheita. Desse grupo de animais com menos de seis meses de idade nas duas primeiras colheitas, quando submetidos às 3ª e 4ª colheitas de amostras, aqueles oito animais foram os únicos reagentes ao BVDV nessas últimas colheitas (dados não mostrados).

Porém, em contraposição à definição do estágio da infecção no rebanho pelo BVDV mencionada anteriormente, a fonte de infecção estaria presente na ocasião da realização da 1ª colheita, pois três dos oito bezerros reagentes tinham aproximadamente 30 dias de idade. Entretanto, tal fonte de infecção provavelmente seria um animal TI, pois caso fosse um animal PI, um número maior de animais teria sido infectado e conseqüentemente maior seria o número de reagentes ao BVDV (SEKI et al., 2006). Considerando o diagnóstico do BVDV pela RT-PCR, a possibilidade da detecção de animais PI seria bem maior do que em animais TI, pois eles apresentam e eliminam constantemente altos títulos do vírus (HOUE, 1995). Já nos animais TI são eliminados baixos títulos do BVDV e por poucos dias (MOERMAN et al., 1993; THURMOND, 2005).

Por outro lado, os anticorpos colostrais podem suprimir todos os vírus livres no soro sanguíneo de bezerros infectados com até seis meses de idade, podendo a pesquisa do BVDV nas amostras de soro sanguíneo desses animais apresentar resultados falso-negativos (BEZEK & MECHOR, 1992; DUBOVI, 1996; SALIKI et al., 1997; STOKSTAD & LOKEN, 2002). Talvez por esse motivo o BVDV não foi detectado na RT-PCR em nenhuma amostra de soro sanguíneo proveniente das duas primeiras colheitas.

Vários fatores puderam ter contribuído para a eliminação espontânea do BVDV no rebanho 1, como o óbito de um animal PI, por exemplo. Além disso, como em muitos rebanhos leiteiros, os animais eram criados em lotes, o que restringia o contato entre todos os animais do rebanho (LINDBERG & HOUE, 2005); os bezerros machos eram descartados logo após o nascimento, e isso reduziria em 50% a probabilidade de um novo animal PI ter sido inserido no rebanho (LINDBERG & ALENIUS, 1999; GUNN et al., 2004); e a imunidade adquirida nos animais jovens teria sido suficiente para a proteção da infecção fetal e da geração de animais PI quando os mesmos tornaram adultos (MUÑOZ-ZANZI et al., 2004). A venda de parte do plantel de reposição desse rebanho, no caso as

novilhas, era uma prática bastante comum. Por isso, outra hipótese seria que a comercialização de novilhas também pôde ter contribuído para a eliminação espontânea do BVDV, pois essas novilhas consistiam no segmento do rebanho com maiores chances de gestação de animais PI.

A característica da longa duração dos títulos de anticorpos nos animais (LINDBERG & ALENIUS, 1999) pôde ser verificada nos animais mais velhos do rebanho 1. Nas duas primeiras colheitas, todas as vacas com mais de cinco anos de idade foram reagentes ao BVDV, e aquelas entre 8 e 10 anos de idade foram os animais que possuíam maiores títulos de anticorpos dentre todos analisados (dados não mostrados).

Em regiões endêmicas, os prejuízos econômicos causados pelo BVDV nos rebanhos são considerados moderados, mas permanecem constantes (SANDVIK, 2004). Essa condição foi observada no rebanho 1, pois segundo o proprietário, a ocorrência de alterações reprodutivas, principalmente em novilhas, e a dificuldade na criação dos bezerros até seis meses de idade, devido a infecções pulmonares e entéricas, era um problema constante no rebanho. O proprietário também informou que justamente aqueles oito bezerros, os quais apresentaram títulos de anticorpos nas duas primeiras colheitas e foram os únicos animais da respectiva faixa etária reagentes ao BVDV na 3ª colheita, eram aqueles que apresentaram atraso no desenvolvimento em relação aos demais animais do mesmo lote. É bem provável que todas as alterações ocorridas eram devidas à infecção pelo BVDV, que pode atuar não somente como agente infeccioso primário, mas também como agente propiciador de infecções secundárias (BROCK, 2004; KOZASA et al., 2005).

Na análise do rebanho 4, verificou-se que a quantidade de animais reagentes ao BVDV foi superior a 90% em 3 das 4 colheitas realizadas, e quase alcançou a totalidade do rebanho na 2ª colheita, com 96% dos animais reagentes (Tabela 3). A pesquisa do BVDV pela RT-PCR foi realizada em 36 amostras provenientes desse rebanho e o vírus foi detectado em cinco amostras. Especificamente, quatro eram provenientes das duas primeiras colheitas de dois animais com menos de seis meses de idade, sendo um deles uma bezerra (amostras 04/58A e 04/58B) e o outro, um bezerro (amostras 04/72A e 04/72B) (Figura 1 – Painel A). Ambos os animais eram PI, pois somente se insere nessa condição quando o BVDV é detectado em amostras provenientes do mesmo animal colhidas num intervalo de pelo menos três semanas (HOUE, 1995). Considerando os resultados encontrados, em relação à classificação proposta por Houe (1995), o rebanho estava inserido naquele estágio em que animais PI com idade superior a quatro meses são diagnosticados em rebanhos nos quais acima de 90% dos animais são reagentes ao BVDV.

Na 3ª colheita, o BVDV também foi detectado numa amostra proveniente de um animal adulto não reagente ao teste de VN (amostra 04/31C) (Figura 1 – Painel B). Entretanto, na 4ª colheita, a amostra do mesmo animal apresentou anticorpos neutralizantes contra o vírus e com título 2.560. Esse animal foi

caracterizado como um animal TI, pois no momento da 3ª colheita estava com a infecção aguda, conseqüentemente o vírus foi debelado e anticorpos foram detectados na colheita seguinte (MOERMAN et al., 1993; LINDBERG & ALENIUS, 1999; SANDVIK, 2004).

O rebanho 4 é um exemplar do típico rebanho bovino brasileiro, o qual apresenta a criação de animais de corte em manejo extensivo, onde todos os segmentos de animais convivem num mesmo lote e apresenta um grande trânsito de animais, ou seja, a constante comercialização de bovinos, o que torna intensa a circulação de animais entre os rebanhos, favorecendo assim à disseminação do BVDV. Esse rebanho era constituído por animais oriundos de diferentes procedências, o que também constitui num importante fator de risco na transmissão do BVDV (SOLIS-CALDERON et al., 2005).

Os bezerros PI detectados nesse estudo eram filhos de duas novilhas provenientes de um desses rebanhos. Elas foram adquiridas 12 meses antes da realização da 1ª colheita e provavelmente estavam gestantes no momento da aquisição. Portanto, tais novilhas poderiam ter sofrido a infecção pelo BVDV antes de serem inseridas no rebanho, ou a infecção ocorreu quando elas já estavam nele. Caso tenha ocorrido essa última hipótese, a fonte de infecção poderia ter sido um animal PI, que já estava presente no rebanho e porventura tivesse sido posteriormente comercializado, ou algum animal TI presente no rebanho no período em que as novilhas estavam no início da gestação. Enfim, dentre todas as hipóteses, é fato que as novilhas foram infectadas e houve a infecção transplacentária que culminou com o nascimento de dois bezerros PI.

Com relação aos animais não reagentes ao BVDV na 1ª e 2ª colheitas, além dos dois animais PI, outros dois animais com idade superior a 24 meses também não foram reagentes ao vírus na 1ª colheita. Entretanto, um deles tornou-se reagente na 2ª colheita e o outro na 3ª colheita. Provavelmente esses animais foram adquiridos pouco tempo antes da realização da primeira colheita e quando inseridos no rebanho entraram em contato com os animais PI. Além disto, o intenso contato dos animais do rebanho com os animais PI foram notados pelos altos títulos de anticorpos (10.240) detectados nos animais das diferentes faixas etárias, portanto, indicativos de infecções recentes e/ou resultantes do estímulo constante promovido pelo BVDV.

No período compreendido entre a 2ª e a 3ª colheitas realizadas no rebanho 4, a bezerra PI foi a óbito, foram comercializadas algumas vacas e novilhas, assim como foram adquiridos outros animais. Logo após a 2ª colheita, foi inserido ao rebanho um lote de novilhas, e próximo à data da realização da 3ª colheita também foram adquiridas algumas novilhas. Nos testes de VN realizados nas amostras provenientes da 3ª colheita, todos os novilhos que haviam sido anteriormente inseridos no rebanho foram reagentes ao BVDV, assim como permaneceram reagentes todos os bovinos que estavam no rebanho na ocasião da 2ª colheita, com exceção do animal PI. No entanto, do lote de novilhas recém-introduzido, duas novilhas foram reagentes ao

vírus enquanto que nove não foram reagentes. Quando submetidas à RT-PCR, o BVDV foi detectado em uma das amostras desse grupo de animais não reagentes no teste de VN (amostra 04/31C) (Figura 1 – Painel B).

Coincidentemente no dia da realização da 3ª colheita, o animal PI, que já era um novilho e até então estava sendo mantido junto aos demais animais do rebanho, foi comercializado. A retirada da fonte de infecção do rebanho pôde ser notada quando realizada a 4ª colheita, pois daquelas nove amostras das novilhas não reagentes ao BVDV no teste de VN da colheita anterior, somente quatro tornaram-se reagentes ao vírus e, dentre elas, aquela em que o BVDV foi detectado na RT-PCR na 3ª colheita (amostra 04/31C), o que a caracterizou como um animal TI. Como parte das novilhas permaneceu não reagente, a transmissão do vírus por meio do animal TI não foi tão eficiente (MOERMAN et al., 1993; LINDBERG & ALENIUS, 1999; SANDVIK, 2004; THURMOND, 2005).

Quando essas novilhas foram inseridas no rebanho, algumas delas estavam com menos de 60 dias de gestação e outras ainda não estavam gestantes. Mesmo tendo sido removido o animal PI, que é a principal fonte de infecção do BVDV (HOUE, 1995), algumas delas já haviam entrado em contato com o vírus, poderiam ter sofrido a infecção fetal e estariam gestantes de bezerros PI. Deste modo, caso tivesse ocorrido tal fato, a infecção no rebanho seria mantida pelos animais PI que posteriormente nasceriam (WITTUM et al., 2001).

Na análise do rebanho 17, em torno de 71% dos animais foram reagentes ao BVDV nos testes de VN nas duas primeiras colheitas (Tabela 4). A 3ª colheita foi realizada apenas nos animais com até oito meses de idade, uma vez que os demais animais do rebanho haviam sido vacinados contra o BVDV depois de realizada a 2ª colheita. Desses animais, nenhum foi reagente, com exceção daqueles que tinham menos de quatro meses de idade, e possivelmente os anticorpos detectados eram de origem colostrar. Na pesquisa do BVDV pela RT-PCR, o vírus não foi detectado em nenhuma das amostras de soro sanguíneo analisadas.

Mediante os resultados encontrados tanto na VN quanto na RT-PCR, quando relacionados aos estágios da infecção pelo BVDV propostos por Houe (1995), sugeriu-se que possivelmente os animais PI teriam sido removidos próximo à ocasião das duas primeiras colheitas, assim como no rebanho 1. Os resultados dos testes de VN realizados em todas as amostras de soro sanguíneo obtidas em três colheitas do rebanho 17, assim como a não amplificação do genoma viral do BVDV na RT-PCR, também forneceram evidências da provável ocorrência da eliminação espontânea do BVDV (LINDBERG & ALENIUS, 1999).

A distribuição dos animais reagentes nas duas primeiras colheitas foi bastante homogênea entre as faixas etárias analisadas, porém com maior ocorrência nos animais adultos (Tabela 4). Esses resultados demonstraram que o BVDV disseminou-se por todo o rebanho, pois animais reagentes ao vírus foram detectados em todos os lotes. Entretanto, os títulos de anticorpos apresentados nas amostras reagentes não foram tão altos quanto aqueles detectados nos demais

rebanhos do estudo, sendo que o título máximo encontrado foi 640 (dados não mostrados).

Considerando a presença de animais reagentes em todo o rebanho, provavelmente a fonte de infecção seria um animal PI. No entanto, não deve ser descartada a hipótese da introdução do BVDV por animais TI, os quais também podem promover a permanência do vírus no rebanho (MOERMAN et al., 1993). A área da propriedade destinada à criação dos bovinos não era extensa e os lotes estavam localizados perto um dos outros. Como o regime de criação desse rebanho era semi-intensivo, os animais tinham acesso às pastagens e um desses lotes tinha contato com animais do rebanho vizinho e a separação entre eles era apenas por cerca. Esse contato constituiria num importante fator de risco para a transmissão do BVDV entre os rebanhos (SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

Antes da realização da primeira colheita, o proprietário informou que a ocorrência de alterações reprodutivas no rebanho tinha aumentado consideravelmente no último ano e que as novilhas eram o segmento mais comprometido do rebanho. Essas informações sugeriram que o agente responsável pelos transtornos reprodutivos seria o BVDV, pois ao infectar rebanhos livres da enfermidade, as alterações reprodutivas são as primeiras conseqüências da infecção a serem notadas (SANDVIK, 2004). Como a comercialização de animais era somente das vacas em lactação, as novilhas permaneciam no rebanho e, quando destinadas à reprodução, teoricamente teriam maior possibilidade de sofrer a infecção fetal, pois eram animais mais jovens e com menores oportunidades de contatos anteriores com BVDV.

Caso a introdução do vírus no rebanho tivesse sido por um animal TI, a infecção nos animais do rebanho poderia ter cessado (MOERMAN et al., 1993), mas poderia ter sido estabelecida a infecção persistente (LINDBERG & HOUE, 2005). Sendo assim, poderia ter existido um período transitório entre a infecção aguda de alguns animais do rebanho e um posterior nascimento de bezerros PI (HOUE, 1994), pois animais PI não foram detectados no rebanho durante o período do monitoramento. É importante mencionar que dentre os rebanhos analisados, o rebanho 17 foi o único que adotou uma medida para o controle da enfermidade: a vacinação contra o BVDV nos animais com idade superior a oito meses. Porém, a utilização da vacina foi realizada após a segunda colheita, o que preveniria apenas a ocorrência das infecções fetais a partir daquele momento (BROCK, 2004; SMITH & GROTELUESCHEN, 2004).

É interessante notar a dinâmica variável da infecção pelo BVDV que existiu nos rebanhos analisados (SANDVIK, 2004). Ao mesmo tempo em que as alterações reprodutivas eram muito evidentes no rebanho 17, a ocorrência do BVDV no rebanho 4 nem era suspeita antes de realizada a pesquisa do vírus e as alterações produtivas e reprodutivas sofridas no rebanho 1 eram moderadas e constantes, sugerindo que a infecção esteve presente nesse último rebanho por um período considerável. Nesta dinâmica, também é importante destacar a provável eliminação espontânea

do BVDV no rebanho 1 e os fatores de risco relacionados à transmissão do BVDV, como a freqüente aquisição de animais de diversas procedências pelo rebanho 4, assim como a provável hipótese da infecção do rebanho 17 ter originado a partir do rebanho vizinho.

No entanto, o principal fator de risco associado com a introdução do BVDV num rebanho é a aquisição de fêmeas gestantes de fetos PI (BROCK, 2004). Possivelmente todos os três rebanhos monitorados contribuíram para a disseminação da enfermidade para outros rebanhos, pois todos comercializavam fêmeas gestantes. Talvez muitos deles que receberam animais nessa condição provenientes desses rebanhos monitorados adquiriram alguns “Cavalos de Tróia” (LINDBERG et al., 2002) e passaram a apresentar as diferentes formas clínicas da BVD após o nascimento dos bezerras PI (BROCK, 2004). O rebanho 4 foi aquele que apresentou aspectos extremamente favoráveis para a disseminação do BVDV para outros rebanhos: a detecção de animais PI demonstrava a presença da atividade viral; o constante trânsito dos animais representava a constante disponibilidade de animais susceptíveis à infecção; e a comercialização de animais de várias faixas etárias, desde bezerras até fêmeas gestantes, consistia na etapa conclusiva para a transmissão do vírus para outros rebanhos.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Apoio e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desta pesquisa (processos 04/06800-0 e 06/59757-0), ao Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, da Universidade Federal de Santa Maria, que gentilmente cedeu as estirpes citopatogênicas do BVDV-1 (Singer) e do BVDV-2 (VS-253) para a realização das reações de VN, e à Assistente de Suporte Acadêmico, Andréa Souza Ramos de Medeiros, pelo auxílio na execução das reações de VN.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LINDBERG, A.; ALENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.197-222, 1999.

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

LINDBERG, A.; NISKANEN, R.; GUSTAFSSON, H.; BENGTSSON, B.; BAULE, C.; BELÁK, S.; ALENIUS, S. Prenatal diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection by detection of

- viral RNA in fetal fluids. **The Veterinary Journal**, v.164, n.2, p.151-155, 2002.
- MOERMAN, A.; STRAVER, P. J.; JONG, M. C. M.; QUAK, J.; BAANVINGER, T.; VAN OIRSCHOT, J. T. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. **The Veterinary Record**, v.132, n.25, p.622-626, 1993.
- MUÑOZ-ZANZI, C. A.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers. **Theriogenology**, v.61, n.6, p.1085-1099, 2004.
- NETTLETON, P. F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses - review. **British Veterinary Journal**, v.151, n.6, p.615-642, 1995.
- OIE. Office International des Épizooties. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Paris. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00132.htm. Acesso em: 30 ago. 2008.
- PILLARS, R. B.; GROOMS, D. L. Serologic evaluation of five unvaccinated heifers to detect herds that have cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.4, p.499-505, 2002.
- PILZ, D.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarréia viral bovina pela RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados. **Semina**, v.26, n.2, p.219-228, 2005.
- QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região sul do Rio Grande do Sul. **Semina**, v.28, n.2, p.269-276, 2007.
- RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Global Status. 26:105-121. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, p.105-121, 2010.
- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v.205, n.1, p.66-74, 1994.
- SALIKI, J. T.; FULTON, R. W.; HULL, S. R.; DUBOVI, E. J. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.803-807, 1997.
- SANDVIK, T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.151-169, 2004.
- SEKI, Y.; SEIMIYIA, Y. N.; YAEGASHI, G.; SATO, C. Identification of herds with cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus by virological evaluation of three calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n.3, p.255-258, 2006.
- SMITH, D.V.; GROTELUESCHEN, D. M. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.131-149, 2004.
- SOLIS-CALDERON, J. J.; SEGURA-CORREA, V. M.; SEGURA-CORREA, J. C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, México: seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, n.1-2, p.253-262, 2005.
- STOKSTAD, M.; LOKEN, T. *Pestivirus* in cattle: experimentally induced persistent infection in calves. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.49, n.10, p.494-501, 2002.
- THURMOND, M. C. Virus transmission. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap.5, p.91-104.
- THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. 556p.
- TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Medicine**, v.91, n.9, p.858-866, 1996.
- WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p.343-346, 2001.
- WITTUM, T. E.; GROTELUESCHEN, D. M.; BROCK, K. V.; KVASNICKA, W. G.; FLOYD, J. G.; KELLING, C. L.; ODDE, K. G. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.49, n.1-2, p.83-94, 2001.