



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS



MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

ANA RAYSA VERDE ABAS

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO VÍRUS
DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM BOVINOS LEITEIROS NO CENTRO-
LESTE MARANHENSE – BRASIL.**

São Luís – MA

2014

ANA RAYSA VERDE ABAS

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO VÍRUS
DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM BOVINOS LEITEIROS NO CENTRO-
LESTE MARANHENSE – BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Defesa Sanitária Animal.

Área: Defesa Sanitária Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

São Luís – MA

2014

Abas, Ana Raysa Verde.

Detecção de anticorpos e fatores de risco associados ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros no centro-leste maranhense - Brasil / Ana Raysa Verde Abas.– São Luís, 2014.

89 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

Orientador: Prof. Hamilton Pereira Santos

1.Diarreia viral bovina. 2.BVDV. 3.Rebanho leiteiro. 4.Maranhão. I.Título

CDU: 636.2.034:616.935(812.1)

ANA RAYSA VERDE ABAS

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO VÍRUS
DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM BOVINOS LEITEIROS NO CENTRO-
LESTE MARANHENSE – BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Curso Mestrado Profissional de Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Defesa Sanitária Animal.

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos – UEMA
(Orientador)

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
(1º Membro)

Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira – UEMA
(2º Membro)

Aos meus pais José Eimar Serra e Sueli Rodrigues Verde por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui, pelo amor, dedicação, oportunidades oferecidas, mas acima de tudo, pelos ensinamentos de vida, valores que levarei comigo para sempre e que são a sustentação de nossa família. Aos meus irmãos Carlos Talvane, Raiane e Rainara por todo apoio e palavras de incentivo. À minha tia Sulamita, sempre pronta a ajudar e muitas vezes desempenhando o papel de segunda mãe. Ao meu esposo Humberto de Campos e meus filhos Vinícius e Isadora, pessoas essenciais em minha vida, meus reais incentivadores, que muitas vezes, suportaram minhas inúmeras ausências em função do curso, atribuo a maior parte do meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades que tem me oferecido e por ter me dado a força necessária para conquistar mais essa vitória;

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pelo empenho em tornar real o Programa de Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal.

À Agência Estadual de Defesa Agropecuária, e principalmente ao atual diretor geral, Dr. Fernando Luís Mendonça Lima, pela oportunidade de crescimento profissional;

Ao prof. Dr. Hamilton Pereira Santos, pela confiança, incentivo e orientação, essenciais para o sucesso durante o desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira, pelo acolhimento, pelo valioso tempo dispensado para solucionar meus questionamentos e pela imensa contribuição como co-orientador, ao longo da realização desse trabalho;

Ao Prof. MSc. Danilo Cutrim Bezerra e ao Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo pela apreciação, correções e sugestões que enriqueceram ainda mais o trabalho escrito.

A Sueli Rodrigues Verde (a melhor mãe do mundo) pela dedicação exclusiva aos meus filhos Vinícius e Isadora ao longo dessa exaustiva jornada.

A Humberto de Campos, que deixou de lado suas atividades para me auxiliar durante as coletas e processamento das amostras. Dificilmente teria chegado até aqui sem o seu apoio e por isso serei eternamente grata.

Ao amigo José Gomes Pereira, por ter despertado em mim o gosto pela pesquisa desde a graduação, por ser um grande incentivador e por estar sempre disposto a apoiar e dar sua contribuição;

A Ana Lucia Abreu Silva e Francisca Neide Costa, dois grandes exemplos, com quem adquiri grande parte do meu senso de organização, disciplina e responsabilidade durante a vida acadêmica.

A Nancylene Pinto Chaves pela colaboração essencial no desenvolvimento do projeto de pesquisa apresentado durante o processo seletivo, agradeço de coração.

A Glenda Barros que abriu mão de seu próprio tempo para colaborar em diversas etapas da realização desse trabalho, durante a revisão de literatura, nas análises laboratoriais e na interpretação dos resultados.

Ao Grupo de Estudo e Pesquisa com Ruminantes Domésticos - GEPRD/UEMA , pela colaboração fundamental durante a realização dos testes laboratoriais; (nomes Diego, Jessica, Emerson, Tais,)

Aos colegas da Unidade Regional de Codó - AGED, e especialmente a Antônio (Alto Alegre), Pedro Belo (Codó), Marcelino (Peritoró), Oziel (Peritoró), Raimundo Ramalho (Coroatá) e Francisco Edson (Timbiras), com quem pude contar na hora de realizar as coletas das amostras;

A todos os professores e funcionários ligados direta ou indiretamente a esta instituição de ensino e que contribuíram na minha formação profissional;

A todos os colegas do curso de mestrado, em especial a Valter Marchão Costa Filho e Adriana Prazeres Paixão, principalmente pela troca de conhecimento, pelo apoio e compreensão que fazem toda a diferença nos momentos mais difíceis, e que me impulsionaram a seguir adiante.

A todos os produtores da Regional de Codó que nos permitiram a entrada em suas propriedades e a coleta de sangue de seus animais, assim como aos vaqueiros que nos auxiliaram nas coletas.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não
sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

ABAS, A. R. V. Detecção de anticorpos e fatores de risco associados ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros no centro-leste maranhense – Brasil. [Antibodies detection and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy cattle in east-central Maranhao – Brazil]. 2014.89 f. Dissertação (Mestrado em Defesa Sanitária Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014.

RESUMO

A Unidade Regional de Codó, localizada no Cento-Leste do estado do Maranhão, apresenta grande potencial para o desenvolvimento da pecuária leiteira moderna, por possuir, além de extensa área territorial, relevo e clima favoráveis, estando pouco exposta a instabilidades climáticas periódicas. O Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo. O presente estudo teve como objetivo estimar a frequência de bovinos reagentes ao vírus da Diarreia Viral Bovina - BVDV em rebanhos leiteiros da Regional de Codó – MA, assim como os fatores de risco associados à infecção. Foram analisadas, pelo teste de Elisa indireto, 396 amostras de soro sanguíneo oriundos de bovinos pertencentes a 33 rebanhos dos municípios de Codó, Timbiras, Coroatá, Peritoró e Alto Alegre. Dos rebanhos testados, encontrou-se um percentual de reagentes de 90,91% (n=30). O município de Codó apresentou a menor frequência, 70% (n=07), enquanto que nos demais municípios, todos os rebanhos apresentaram pelo menos um animal que reagiu positivamente. Das 396 amostras analisadas, 54,04% (n = 214) foram reagentes, 3,79% (n = 15) suspeitas e 42,17% (n = 167) não reagentes. As frequências de bovinos sorologicamente reagentes ao BVDV foram de 34,17% (n=41) em Codó, 52,78 (n=19) em Timbiras, 55,95% (n = 47) em Coroatá, 83,33 (n = 60) em Peritoró e 55,95% (n = 47) em Alto Alegre. Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que o BVDV está amplamente distribuído nos rebanhos da regional de Codó e que, estatisticamente, dentre os fatores de risco avaliados, apenas a faixa etária dos animais apresentou associação com a infecção pelo vírus.

Palavras-chave: Diarreia Viral Bovina, bovinos, ELISA, Maranhão.

ABSTRACT

The Codo Regional Unit located in the east-central state of Maranhao, has great potential for the development of modern dairy farming, for having, in addition to extensive land area, topography and favorable climate, with little exposed to periodic climatic instability. The bovine viral diarrhea virus - BVDV - is one of the most significant pathogens of cattle and causes large economic losses to the livestock industry worldwide (Baker 1995). The present study aimed to estimate the frequency of cattle reagents to bovine Viral Diarrhea virus - BVDV in dairy herds of Regional Codo - MA as well as the risk factors associated with infection. By indirect ELISA test, 396 serum samples derived from 33 cattle herds belonging to municipalities of Codo, Timbiras, Coroata, Peritoro and Alto Alegre were analyzed. Herds tested, was found a percentage of 90 % (n=30) reagent percentage. The municipality of Codo had the lowest frequency, 70% (n = 07), while in other municipalities, at least one animal which tested positive. Of the 396 samples analyzed, 54.04% (n = 214) were positive, 3.79% (n = 15) suspected and 42.17% (n = 167) were negative. The frequencies of serologically reactive to BVDV cattle were 34.17% (n = 41) in Codo, 52.78 (n = 19) in Timbiras, 55.95% (n = 47) in Coroata, 83.33 (n = 60) in Peritoro e and 55.95% (n = 47) in Alto Alegre. he results obtained in this study showed that BVDV is widely distributed in herds of regional Codo and that, statistically, among the risk factors evaluated, only the age of the animals was associated with virus infection.

KEYWORDS: Bovine Viral Diarrhea, cattle, ELISA, Maranhao.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Mapa dos municípios que constituem a Unidade Regional de Codó.....	41
FIGURA 02: Fórmula do cálculo amostral	42
FIGURAS 03: Fotografia da punção da veia jugular de bovino	44
FIGURA 04: Fotografia evidenciando o detalhe da punção da veia jugular de bovino utilizando tubos a vácuo	44
FIGURA 05: Fotografia do processo de coleta das amostras de sangue bovino, acondicionamento e centrifugação: (a) tubos vacutainer siliconizados com amostras de sangue total, (b) centrifugação das amostras de sangue, (c) tubos eppendorf contendo amostras de soro em duplicata	45
FIGURA 06. Fotografia do teste de ELISA-indireto, para identificação de anticorpos contra o BVDV: a) Kit” comercial de ELISA IDEXX BVDV Total Ab, b) Placa impregnada com antígeno BVDV, c) Adição de diluente de amostra para sensibilização das placas	46
FIGURA 07. Fotografia do teste de ELISA-indireto, para identificação de anticorpos contra o BVDV: a) Placa com coloração azul após a adição do conjugado, b) Placa evidenciando a mudança de coloração do azul para amarelo após a adição do substrato, c) Placa após a adição de substrato e da solução de interrupção, d) Placa preparada para iniciar a leitura no espectrofotômetro, e) Resultado obtido após leitura da placa.	47
FIGURAS 08 e 09: Aplicação de questionário epidemiológico para análise dos fatores de risco	48
FIGURA 10: Mapa da distribuição das propriedades reagentes para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) na Unidade Regional de Codó	50
FIGURA 11: Mapa da distribuição das propriedades reagentes para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) na Unidade Regional de Codó	51
FIGURA 12. Gráfico da frequência de rebanhos reagentes para o Vírus da Diarréia Viral Bovina nos municípios pertencentes à Unidade Regional de Codó – MA – Brasil, 2014	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Frequência de anticorpos contra o vírus do BVDV em rebanhos leiteiros de cinco municípios da Regional de Codó – MA	49
Tabela 02. Frequência de anticorpos contra o BVDV em bovinos leiteiros dos cinco municípios da Regional de Codó – MA.	52
TABELA 03. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Codó – MA.	53
TABELA 04. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Timbiras – MA.	53
TABELA 05. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Coroatá – MA.	54
TABELA 06. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Peritoró – MA.	54
TABELA 07. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Alto Alegre – MA.	54
TABELA 08. Frequência de bovinos positivos para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), de acordo com a faixa etária, na Regional de Codó – Maranhão - Brasil, 2014.	55
TABELA 09. Frequência de fêmeas bovinas positivas para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), de acordo com a faixa etária, na regional de Codó – Maranhão - Brasil, 2014.	55
TABELA 10. Frequência de reprodutores bovinos positivos para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), de acordo com a faixa etária, na regional de Codó – Maranhão - Brasil, 2014.	56
TABELA 11. Resultado da análise dos fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em 33 rebanhos bovinos de aptidão leiteira na Regional de Codó – MA – Brasil	59

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01. Quantidade de bovinos amostrados por rebanho	42
QUADRO 02. Número de rebanhos selecionados por município	43
QUADRO 03. Número de rebanhos selecionados por município.	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGED – Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

BVD – Diarréia Viral Bovina

BVDV – Vírus da Diarreia Viral Bovina

CSFV- Classical Swine Fever Virus

DM – Doença das mucosas

EIE – Ensaio imunoenzimático

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH – Índice de desenvolvimento humano

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NCP – Não citopatogênico

CP - Citopatogênico

PCR - Reação em cadeia de polimerase

PI – Persistentemente infectado

PIB – Produto Interno Bruto

RT-PCR – Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa

SIE – Serviço de Inspeção Estadual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	Histórico	20
3.2	Etiologia	21
3.3	Epidemiologia	22
3.4	Patogenia	24
3.5	Sinais clínicos	27
3.6	Diagnóstico	31
3.7	Impactos econômicos	33
3.8	Situação da diarreia viral bovina no mundo.....	34
3.9	Situação da diarreia viral bovina no Brasil	36
3.10	Tratamento	37
3.12	Controle e prevenção	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Região	41
4.2	Características do rebanho	42
4.3	Coleta das amostras	42
4.4	Análise das amostras	46
4.5	Fatores de risco	48
4.6	Análise estatística	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	74
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

A Unidade Regional de Codó, constituída pelos municípios de Codó, Timbiras, Coroatá, Peritoró, Alto Alegre do Maranhão e São Mateus, localiza-se na região centro/leste do Estado do Maranhão, limitando-se com as regionais de Caxias, Presidente Dutra, Pedreiras, Itapecuru, Chapadinha e Bacabal (AGED, 2014). Possui uma área territorial de 10.066,22 Km² e uma população estimada em 292.653 habitantes. (IBGE, 2010)

Apresenta o índice de desenvolvimento humano (IDH) médio de 0,574 (IBGE, 2010 e tem uma grande participação no produto interno bruto (PIB) do estado, principalmente em função do município de Codó que tem como sua principal atividade econômica a Indústria de Transformação (Fabricação de Cimento), destacando-se ainda a administração pública, a atividade Imobiliária, aluguéis e comércio. Considerando o ano de 2010, o município destacou-se em 7º lugar na participação do PIB estadual, perdendo apenas para os municípios de São Luís (1º), Imperatriz (2º), Açailândia (3º), Balsas (4º), Timon (5º) e Caxias (6º) (IMESC, 2010)

A agropecuária também representa importante papel para o desenvolvimento da região, que possui um efetivo bovino total de 221.938 cabeças distribuídas em 2.240 propriedades. Segundo a Agência Estadual de Defesa Agropecuária (2013), o rebanho leiteiro corresponde a 3,3% (7.416 bovinos) do efetivo. Esse potencial tem trazido investimentos para o setor e hoje, a regional já possui duas usinas de beneficiamento de leite com Serviço de Inspeção estadual (S.I.E), que agregam valor ao produto e oferecem mensalmente ao mercado consumidor produtos de qualidade como: leite pasteurizado (3.028 litros/mês), iogurte (3.761 kg/mês), bebida láctea (4.416 litros/mês) e queijo coalho (95 kg/mês) (AGED, 2014).

A atividade leiteira tem um importante papel na sustentabilidade das propriedades agrícolas, tanto no que diz respeito ao autoconsumo, como na geração de renda. De 1996 a 2005, o Maranhão aumentou sua participação na produção de leite em relação ao Brasil de 0,8% para 1,3% (CARVALHO, 2007). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2009), o estado produziu 355.082.000 litros de leite, o que correspondeu a 13,49% da produção do Nordeste (2.631.436.000 litros) e 1,21% da produção brasileira (29.105.487.000 litros).

A atividade sempre foi desafiada pelos problemas de sanidade, mas nos últimos anos, a grande competitividade e redução das margens de lucro do setor têm evidenciado os prejuízos causados pelas doenças infecciosas. (FARIA, 2013).

A Diarréia Viral Bovina (BVD) é uma das enfermidade dos bovinos, e também de outros ruminantes, que causa grandes perdas econômicas em toda a cadeia produtiva. Inicialmente descrita por Olafson et al. em 1946, somente nas últimas duas décadas tornou-se mais conhecida pelo mundo. Com uma distribuição geográfica cosmopolita, 50 a 90% da população bovina adulta apresenta anticorpos no soro sanguíneo contra o vírus da BVD. Por isto, teoricamente, acredita-se que todos os rebanhos bovinos estão infectados e a prevalência de anticorpos em animais adultos está em torno de 60% (LAZZARI et al, 2008).

De acordo com o MAPA (2013), a notificação da suspeita ou ocorrência da BVD é obrigatória para qualquer cidadão, bem como para todo profissional que atue na área de diagnóstico, ensino ou pesquisa em saúde animal. Ainda assim, a subnotificação é frequente, e muitas vezes os casos da enfermidade passam despercebidos nos rebanhos da região.

A infecção pelo BVDV tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações, desde infecções subclínicas até formas mais graves com destaque para a Doença das Mucosas, com mortalidade elevada. A infecção de fêmeas gestantes soronegativas pode provocar morte embrionária, múltiplos defeitos congênitos nos fetos, abortos ou o nascimento de vitelos persistentemente infectados (PI) por infecção transplacentária entre os 45 e 125 dias de gestação. A infecção pelo BVDV ainda pode provocar repetição do estro, diminuição da produção leiteira, bem como atraso no crescimento e ganho de peso (CANÁRIO, 2009).

Nos países que já são livres da Febre Aftosa (Canadá, EUA, Grã-Bretânia e México), o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) é considerado o agente viral mais importante da bovinocultura e tem sido alvo de numerosos estudos e programas de controle e/ou erradicação durante décadas (FLORES et al., 2005).

Estudos recentes têm demonstrado que essa infecção está amplamente difundida no rebanho bovino do Brasil e que as amostras brasileiras do vírus apresentam variabilidade antigênica marcante. Ainda assim, o serviço oficial de defesa sanitária animal, produtores, médicos veterinários autônomos e pesquisadores têm dado pouca importância para o seu

controle, o que poderá causar num futuro próximo, a imposição de embargos aos produtos brasileiros por parte do comércio internacional, que vem continuamente buscando a eliminação de enfermidades como essa de seus rebanhos.

Considerando a importância que a enfermidade possui, principalmente quando se trata de atividade leiteira; aliado a práticas deficientes e/ou inexistentes de sanidade nas propriedades, assim como a ausência de programas de assistência técnica especializada; e ainda a inexistência de dados epidemiológicos suficientes sobre a ocorrência de BVD na Região centro-Leste do Maranhão, justifica-se a realização do presente trabalho, que teve como objetivo, conhecer a situação da BVD, através de estudo soroepidemiológico na população bovina de aptidão leiteira existente na região.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a situação da Diarréia Viral Bovina na população bovina de aptidão leiteira da regional de Codó.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar a frequência de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em rebanhos leiteiros dos municípios que compõe a Regional de Codó, no Estado do Maranhão;
- Identificar a faixa etária de bovinos em que mais ocorre a infecção pelo BVDV;
- Identificar possíveis fatores de risco associados à enfermidade;
- Realizar o estudo espacial através do georreferenciamento dos rebanhos foco para diarreia viral bovina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo (BAKER 1995).

O BVDV está também associado à doença das mucosas, que evolui com baixa morbidade e elevada letalidade, provocando elevadas perdas financeiras devidas à morte dos animais clinicamente doentes, queda na produção entre os restantes e elevados custos veterinários, nas explorações onde ocorre (RIBEIRO e PEREIRA, 2004)

3.1 Histórico

A Diarréia Viral Bovina (BVD) teve sua primeira descrição em 1946, por Olafson, em Nova York, EUA, desde os primeiros relatos de uma nova enfermidade aparentemente transmissível (BROCK, 2004). A princípio, parecia haver correlação com o vírus da peste bovina, mas testes de soroneutralização provaram não existir (MAYR et al 1988). Mais tarde, em 1953, Ramsey & Chivres observaram outro quadro clínico que lembrava o da diarréia viral, mas que evoluía com pouca contagiosidade e morbidade, mas com mortalidade bem superior a diarréia viral. Devido a intensas lesões erosivas e ulcerativas que apareceram em todo o tubo digestivo, esta doença foi denominada doença das mucosas (BEER, 1999).

Com o passar do tempo, a doença recebeu várias denominações como diarréia a vírus de Nova York, diarréia a vírus de Indiana e enfermidade das mucosas, sem suspeitarem de que era o mesmo agente que causava as diferentes manifestações clínica-patológicas (GROENS, 2002).

No Brasil, vários relatos clínico-patológicos e sorológicos têm demonstrado a presença da infecção no país desde o final dos anos 60. O primeiro relato foi uma descrição de doença gastroentérica, com aspectos clínicos e patológicos compatíveis com a forma clássica da infecção, a Doença das Mucosas (CORRÊA, 1968).

Os primeiros estudos sorológicos da infecção no Brasil datam do início da década de 70, no Rio Grande do Sul (WIZIGMANN et al. 1972). Desde então, diversos estudos

sorológicos têm sido realizados em várias regiões, demonstrando a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro (FLORES, 2005).

O BVDV foi isolado pela primeira vez no Brasil por Vidor em 1974, a partir de amostras de soro bovino colhidas em abatedouros no Estado do Rio Grande do Sul. Na Região Nordeste o vírus foi identificado inicialmente no Estado da Bahia por Ribeiro et al. (1987) que detectaram em uma amostragem de 1618 soros, 14,64% de amostras positivas. Já Castro et al. (1993), obtiveram 72,6% de prevalência em 288 soros bovinos, oriundos do Estado do Pernambuco. Foram estudadas 102 amostras de soros bovinos provenientes do Estado de Sergipe, onde foi estimada uma prevalência variando de 58,23% a 71,18% de animais positivos (MELO et al., 1997).

Oliveira et al. (1996) realizaram o primeiro estudo sobre animais PI no Brasil, mostrando uma frequência de 1,2%. Posteriormente, Botton et al. (1998) observaram um índice de 0,75% (BRITO et al., 2010).

3.2 Etiologia

O BVDV pertence à família Flaviviridae, gênero Pestivirus, que abriga outros dois vírus antígenicamente relacionados: o vírus da Peste Suína Clássica (Classical swine fever virus, CSFV) e o vírus da Doença da Fronteira, de ovinos (Border disease virus, BDV) (HORZINEK, 1991). Essa proximidade filogenética permite a infecção cruzada entre as espécies, o que pode comprometer a acurácia dos métodos sorológicos de diagnóstico (BAKER, 1995; RADOSTITIS ET AL., 2007).

Os vírions do BVDV são partículas esféricas com aproximadamente 50nm de diâmetro com um envelope firmemente aderido contendo glicopeptídeos (NETTLETON et al., 1995; SCHUCH, 2001; POTGIETER, 2004). O genoma do BVDV consiste uma fita simples de RNA com polaridade positiva e contém um esqueleto genético que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

O BVDV tem como característica marcante a enorme variabilidade antigênica, que lhe confere altas frequências de mutações e recombinações genéticas. (DONIS, 1995; STRAUSS et al, 1996). De acordo com a capacidade de produzir citopatologia em cultivo celular, os isolados de BVDV podem ser classificados em biotipos citopático [CP] e não-citopático [NCP]. A grande maioria dos vírus de campo são NCP; amostras CP são isoladas

quase que exclusivamente de animais acometidos da Doença das Mucosas [DM], uma forma clínica severa da infecção (BROWNLIE 1990, BAKER 1995).

Dois grupos antigênicos principais já foram identificados: BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2. Os vírus do genótipo BVDV-1 representam a maioria dos vírus vacinais e das cepas de referência, enquanto os BVDV-2 foram identificados há pouco mais de uma década em surtos de Diarréia Viral Bovina [BVD] aguda severa e doença hemorrágica na América do Norte (PELLERIN et al. 1994, RIDPATH et al. 1994) entretanto hoje se sabe que a virulência e a patogenicidade do vírus independem de seu grupo genotípico (FINO et al., 2012; FLORES et al., 2005).

Amostras do tipo 2 têm sido identificadas predominantemente nos Estados Unidos e Canadá (CARMAN et al., 1998), com poucos relatos na Europa (WAKELEY et al., 2003) e no Brasil (CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2000).

O BVDV é sensível a solventes lipídicos como éter e clorofórmio e é inativado por tratamento com tripsina. O vírus é mais estável na faixa de pH 5,7 a 9,3, com estabilidade máxima em pH de 7,4. O vírus é facilmente mantido em estado liofilizado ou congelado (-70°C) por vários anos (HIRSH, et al., 2003).

3.3 Epidemiologia

O BVDV tem distribuição mundial e a prevalência de anticorpos chega a atingir 70 a 80% dos animais e até 80% dos rebanhos (FLORES et al., 2005).

A infecção natural ocorre em bovinos, e também em ovinos, suínos, caprinos, ruminantes de vida livre ou de cativeiro (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). São também susceptíveis coelhos, búfalos, lhamas e alpacas (BEER, 1999), essas espécies, portanto, são consideradas fontes potenciais de infecção (HOUE, 1995), mas seu exato papel na epidemiologia ainda deve ser esclarecido (POTGIETER, 2004).

O BVDV é altamente infeccioso (LONERAGAN et al., 2005). A prevalência da infecção nos rebanhos é alta e nos bovinos acima de um ano de idade 60 a 80% possuem anticorpos neutralizantes séricos para o BVDV. Entretanto, a incidência da doença das mucosas é baixa (SCHMITZ, 2006).

A infecção fetal entre os dias 90 e 120 de gestação frequentemente resultam na produção de bezerros imunotolerantes, persistentemente infectados (PI). Os bezerros PI constituem-se no ponto-chave da epidemiologia da infecção, pois são soronegativos, muitas vezes saudáveis e eliminam o vírus continuamente em secreções e excreções (GONDIM, 2006).

Os programas de vacinação e a existência de bovinos PI que excretam o vírus são responsáveis pelos animais sorologicamente positivos em um rebanho (HOUE, 1995; RADOSTITS et al., 2002). Portanto, exceto em áreas que utilizam vacinação, a prevalência de portadores de anticorpos reflete a proporção de animais previamente expostos ao BVDV em algum momento de sua vida (HOUE, 1995).

Rebanhos que contém bovinos PI têm alta proporção de animais soropositivos. Rebanhos com poucos animais imunes têm mais risco de infecção o que aumenta a suscetibilidade do rebanho ao BVDV e conseqüentemente a possibilidade de nascimento de bovinos PI (POTGIETER, 2004).

Um aspecto epidemiológico importante dos animais persistentemente infectados é que estes são, na maioria das vezes, clinicamente normais. O vírus está presente na maioria dos tecidos, é eliminado intermitentemente e pode ser isolado de qualquer secreção e excreção, tais como descarga nasal, saliva, sêmen, urina, lágrima e leite (CORIA EMCCLURKIN, 1978; RADOSTITS e LITTLEJOHNS, 1988; MEYLING et al., 1990).

Os animais não vacinados, inadequadamente vacinados ou aqueles cuja situação imune declinou são mais suscetíveis à infecção e possuem potencial para doença clínica. Os animais vacinados podem ser suscetíveis, se os isolamentos a campo do vírus forem distintos dos usados na vacina (RADOSTITS et al., 2002).

A transmissão pode ocorrer de forma vertical e horizontal (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). A transmissão horizontal pode ainda ser direta ou indireta (BAKER, 1987; HOUE, 1995; POTGIETER, 2004).

A doença também pode ser espalhada pelo contato direto com animais mortos e através de insetos sugadores (BAILEY, 1987), como também através de agulhas/material cirúrgico contaminado e luvas de palpação (FLORES, 2003).

3.4 Patogenia

Dentre os vírus que infectam bovinos, o BVDV é o que possui a patogenia mais complexa (DEREGT, 2005). Ao contrário da denominação original, relacionada a transtornos do sistema digestório, a BVD é caracterizada, principalmente, por alterações no sistema reprodutivo dos bovinos (BROWNLIE, 2005).

A patogenia da infecção depende de múltiplos fatores acerca das fases pós-natal e intra-uterina do hospedeiro (Baker 1995, Radostits et al. 2007). O epitélio do trato respiratório superior, orofaringe e o tecido linfóide regional são os sítios primários de replicação viral após infecção pela via oro-nasal. O vírus também possui tropismo pelas células das linhagens germinativas de ambos os sexos, sendo encontrado no sêmen e em folículos ovarianos (GROOMS, 2004) e por tecidos em constante divisão, logo as placas de Peyer e o feto são os principais locais de multiplicação do BVDV. A viremia ocorre entre três e 10 dias pós-infecção e o vírus pode ser isolado do sangue nesse período (BROWNLIE, 2002; FLORES 2007).

O BVDV tem a capacidade de deprimir o sistema imune de bovinos provocando a depleção das células de defesa - linfócitos T e B - e afetando a função macrofágica, predispondo, assim, o organismo do hospedeiro às infecções secundárias (RADOSTITS et al. 2007). O intervalo entre a infecção do conceito e a ocorrência do abortamento pode variar de 10 dias até alguns meses, por isso é comum encontrar abortamentos de fetos edemaciados ou autolisados Frederiksen et al. (1999).

3.4.1. Infecção pós-natal primária

Primeiramente o vírus se replica na mucosa nasal e posteriormente alcança altos títulos nas tonsilas. Em seguida ele se difunde aos linfonodos regionais seguidos de disseminação sanguínea, associado às células (leucócitos), pelo corpo. A replicação viral normalmente se desenvolve nas tonsilas, timo e íleo. Megacariócitos e linfócitos constituem importantes alvos do vírus. O BVDV induz necrose dessas células e prejudica a função daquelas que sobrevivem à infecção (POTGIETER, 2004).

3.4.2. Infecção intra-uterina

Os problemas relacionados ao BVDV durante a gestação são complexos (EVERMANN et al., 2002) e dependem do momento da infecção e da vulnerabilidade do hospedeiro (GROOMS, 2004; EVERMANN et al., 2002). A variação da cepa viral é o meio pelo qual o vírus pode ser mantido em uma população bovina (POTGIETER, 1995; EVERMANN et al., 2002; GROOMS, 2004). Os fatores do hospedeiro associados com a infecção pelo BVDV são o estado imunológico das novilhas no início da fase reprodutiva (NETTLETON et al., 1995; EVERMANN et al., 2002) e a imunodepressão fisiológica que ocorre durante a gestação (EVERMANN et al., 2002; GROOMS, 2004).

Em vacas prenhes imunocompetentes e nas infecções fetais, o BVDV pode causar significativa perda reprodutiva inicial como falha de fertilização, mortalidade embrionária e abortamento (RADOSTITS et al., 2002; GROOMS, 2004; PORTGIETER, 2004). A infecção do feto bovino com o biótipo NCP antes do desenvolvimento da competência imunológica, isto é, até 125 dias de gestação, pode resultar na geração de um animal que apresenta uma infecção persistente, pelo BVDV por toda sua vida. (DEREGT; LOEWEN, 1995; DUBOVI, 1998; GROOMS, 2004).

O BVDV tem importante efeito teratogênico em bovinos e pode suceder infecção transplacentária durante o segundo trimestre de gestação (entre 100 e 150 dias) (BROWN et al., 1974; POTGIETER, 2004). Este período de desenvolvimento fetal corresponde ao estágio final da organogênese e desenvolvimento do sistema imune fetal (BAKER, 1987; NETTLETON et al., 1995; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004). A infecção neste período resulta em destruição das células tronco, resultando em defeitos congênitos (BAKER, 1987).

Infecções transplacentárias pelo BVDV durante o terceiro trimestre de prenhez em bovinos geralmente não resultam em doença fetal e são análogas às infecções primárias pós-natais (MOENNIG et al., 1995; POTGIETER, 2004). Nesse estágio os fetos montam uma resposta imune relativamente normal e frequentemente nascem com anticorpos circulantes para o vírus (STOKSTAD et al., 2002; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004).

3.4.3. Animais Persistentemente infectados (PI)

Este fato foi descrito pela primeira vez em um touro aparentemente saudável (Coria & McClurkin, 1978), e posteriormente reproduzido experimentalmente (Liess et al.,

1984; McClurkin et al., 1984). Embora o exato mecanismo da imunotolerância não esteja esclarecido, é sabido que a circulação do vírus durante o período gestacional em que a imunocompetência esteja se desenvolvendo (90 a 120 dias) é um pré-requisito para a persistência. Proteínas virais são reconhecidas como antígenos próprios, gerando seleção negativa de linfócitos B e T específicos para BVDV durante sua formação, o que resulta em ausência de anticorpos contra o vírus persistente. Não está claro o exato estágio do desenvolvimento fetal em que a infecção deve ocorrer para causar imunotolerância, mas sob condições experimentais a persistência ocorreu em 86% e 100% dos bezerros nascidos de vacas infectadas com BVDV no 18º e 30º dia de gestação, respectivamente (Kirkland et al., 1993). Em outros estudos a infecção persistente foi induzida em 100% dos fetos originados de matrizes desafiadas aos 75 dias de gestação (Brock & Chase, 2000; Brock & Cortese, 2001; Cortese et al., 1998). A infecção persistente é rara se a infecção fetal ocorrer após o 100º dia, mas já foi relatada após infecção no dia 125 de gestação (Baker, 1995).

A infecção persistente pode ser estabelecida tanto pelo BVDV 1 quanto pelo BVDV 2 (LIEBLER-TENORIO, 2005) e está associada somente ao biótipo NCP do BVDV, porém é específica para a estirpe infectante. Embora sejam imunotolerantes ao BVDV, os animais PI são imunocompetentes a outros antígenos (BROCK, 1995) e desenvolvem resposta imunológica contra as estirpes heterólogas do BVDV (BAKER, 1995). A imunotolerância é o mecanismo pelo qual o BVDV mantém-se nos rebanhos por transmissão direta e indireta (BROCK, 2003). Num rebanho infectado pelo BVDV, existem duas potenciais fontes de infecção: o bovino PI e o bovino que está na fase aguda da enfermidade, denominado transitoriamente infectado (TI) (HOUE, 1994; LINDBERG & HOUE, 2005). No aspecto epidemiológico, os bovinos PI são considerados a principal fonte de infecção, porque eliminam por toda sua vida uma grande quantidade de vírus em secreções e excreções (HOUE, 1995). O BVDV está amplamente distribuído por todos os órgãos corporais do animal PI e por isso são liberadas constantemente grandes quantidades do vírus no meio ambiente (BROWNLIE, 1990).

3.4.4. Doença das mucosas

Acomete, exclusivamente, animais PI imunotolerantes ao biótipo NCP de BVDV, que sofrem uma superinfecção com uma estirpe homóloga do biótipo CP do vírus. O vírus CP é, geralmente, originado a partir de mutações ou recombinações genéticas do biótipo NCP do próprio animal, no entanto, fontes virais externas, como a aplicação de vacinas vivas

modificadas ou infecção com o vírus CP decorrente da transmissão por outros animais, também podem resultar na manifestação da doença (BAKER 1995, FLORES et al. 2005, FLORES 2007, RADOSTITS et al. 2007).

A mutação responsável por converter o biótipo do vírus residente no animal PI não afeta a antigenicidade, assim o novo biótipo não é combatido pelo sistema imune (POTGIETER, 2004). Uma hipótese é que o BVDV citopático se espalha pelo hospedeiro, causando, entre outras lesões, a depleção progressiva do tecido linfoide associado ao intestino e necrose de sua mucosa sobrejacente. Inicialmente o vírus citopático é mais encontrado nas tonsilas, linfonodos, placas de Peyer e nódulos linfáticos do intestino grosso e posteriormente, uma distribuição difusa do vírus pelo epitélio intestinal parece corresponder ao advento da doença clínica (LIEBLER-TENORIO et al., 1997; LOPEZ et al., 1993).

3.5 Sinais clínicos

O período de incubação da BVD é de aproximadamente 5 a 7 dias, e a viremia é detectada nas primeiras 24 horas após a infecção, podendo persistir por até 15 dias (BAKER, 1995).

A manifestação clínica após a infecção pelo BVDV é dependente de múltiplos fatores: agentes, hospedeiro e ambiente. Entre os fatores do hospedeiro estão a imunocompetência e a imunotolerância ao BVDV, estado imune (passivo pelos anticorpos colostrais ou ativo pela exposição ao BVDV ou vacinação), gestações nas fêmeas, idade gestacional do feto no momento da infecção, nível de estresse ambiental no momento da infecção e concorrência com outros patógenos (RADOSTITS et al., 2002; BOLIN et al., 2004).

O BVDV está relacionado a um complexo de síndromes que afetam os sistemas reprodutivo, respiratório, digestório, circulatório, imunológico, linfático, musculoesquelético e o sistema nervoso central, sendo denominado como um patógeno que apresenta muitas faces (BROCK, 2004).

Tradicionalmente, as manifestações da infecção pelo BVDV são apresentadas em três categorias: infecção pós-natal ou BVD, infecção fetal e doença das mucosas (BIELEFELDTOMANN, 1995; POTGIETER, 2004).

3.5.1. Infecção aguda pós-natal em animal imunocompetente e não gestante

Em bovinos imunocompetentes e não prenhes a enfermidade é, de modo geral, assintomática ou subclínica, de caráter autolimitante, que cursa com quadros de depressão, febre, inapetência, diarreia leve e leucopenia transitória (BAKER 1995, RADOSTITS et al. 2007). Em vacas de leite, a diminuição da produção leiteira tem sido associada a infecções subclínicas (Evermann & Barrington, 2005).

A infecção clínica aguda pelo BVDV é frequentemente definida pela doença clínica que ocorre em bovinos imunocompetentes que não são PI. (EVERMANN & BARRINGTON, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005). Esta síndrome ocorre geralmente em bovinos com idades compreendidas entre 6 a 24 meses (EVERMANN & BARRINGTON, 2005; GROOMS et al, 2006) . Os sinais clínicos mais evidentes são febre transitória, depressão, anorexia, descargas óculo-nasais, salivação, diarreia aquosa e, ocasionalmente, erosões e ulcerações orais (POTGIETER, 2004). Devido à sua capacidade imunodepressora podem ser observados problemas entéricos e/ou respiratórios (PEDRIZET et al., 1987). Poderão estar presentes erosões epiteliais no espaço interdigital, bordo coronário, tetos e vulva (EVERMANN & BARRINGTON, 2005). A viremia pode persistir por até 15 dias, período este em que o vírus é eliminado em pequenas quantidades.(GROOMS et al, 2006). Contudo, a duração dos sinais clínicos é variável e depende da duração da viremia, virulência do vírus infectante, presença de infecções secundárias e capacidade regenerativa dos tecidos afetados (EVERMANN & BARRINGTON, 2005).

3.5.2. Infecção intrauterina (congenita)

Quando a infecção ocorre em fêmeas gestantes o feto pode ser afetado. Podemos então observar falhas reprodutivas, baixa taxa de concepção, nascimento de animais com defeitos congênitos, nascimento de bezerro com peso corporal inferior à média da raça e fracos, atrasos de crescimento, abortamento, mortalidade neonatal e mumificação fetal (DUBOVI, 1994; TREMBLEY, 1996).

As consequências da infecção fetal normalmente são observadas desde várias semanas a vários meses depois da infecção materna e são determinadas pela fase da gestação em que a fêmea é infectada, biótipo (CP/NCP) e pela estirpe do vírus (FLORES ET AL., 2005; GONDIM, 2006; LIEBLER-TENORIO, 2005)

A infecção pelo BVDV no período entre 37 a 99 dias de gestação leva frequentemente ao aborto, podendo causar também mumificação fetal e nascimento de natimortos (CASARO et al., 1971; MEYLING et al., 1987; SCOTT et al., 1973; McCLURKIN et al., 1984; BROWNLIE et al., 1973).

Macroscopicamente, observa-se esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e lesões necrosantes no miocárdio e pulmões. Os achados histológicos caracterizam-se por infiltrado mononuclear no miocárdio, baço, linfonodos e na região periportal do fígado (Potgieter 2004).

Matrizes infectadas entre 40 e 120 dias de gestação, em geral, dão origem a bezerros persistentemente infectados (PI), visto que durante o referido período o sistema imunológico fetal está em formação e só estará concluído por volta do 125º dia gestacional. Consequentemente ocorre uma incorporação errônea das proteínas viras como sendo próprias do organismo e o sistema imune do hospedeiro não forma anticorpos contra BVDV, tornando os animais infectados imunotolerantes ao vírus infectante. Estes animais, apesar de serem soronegativos, são portadores e eliminam o vírus continuamente em secreções e excreções sendo considerados a principal fonte de novas infecções (BAKER, 1995; POTGIETER, 2004; FLORES, 2007; RADOSTITS et al. 2007; BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995).

A maioria dos bezerros PI nasce fraca e debilitada, em geral com o aparecimento de problemas respiratórios, apresentam crescimento retardado, malformações congênitas e morrem no primeiro ano de vida. Contudo, existem diversos relatos de animais nessa condição que sobrevive até a idade adulta e são capazes de se reproduzir, gerando progênes PI (Flores 2007).

A infecção do feto entre 100 e 150 dias de gestação resulta em uma ampla variedade de anomalias congênitas, especialmente, no que se refere a problemas no sistema nervoso, já que este período corresponde ao estágio final de sua organogênese. Os problemas encontrados com mais frequência são hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, microcefalia, mielinização deficiente da medula espinhal, atrofia ou displasia da retina, microftalmia, catarata, além de hipoplasia tímica, hipotricose, barquignatismo e artrogripose (Flores 2007; Radostits et al. 2007).

Após os 150 dias de gestação o feto está geralmente apto a desenvolver uma resposta imunológica eficaz, sendo capaz de responder à infecção e eventualmente eliminar completamente o vírus. (CASARO et al., 1971; BROWN et al., 1979). O animal nasce soropositivo, mas livre do vírus. Para detectar este tipo de infecção, o soro deve ser colhido antes da ingestão do colostro. Estes vitelos são normais ao nascimento e têm anticorpos neutralizantes pré-colostrais contra o BVDV. (BROCK, 2004; GROOMS, 2006; OIE, 2008)

3.5.3 Doença das mucosas

A Doença das mucosas (DM) geralmente é esporádica acometendo, principalmente, animais de 6 a 24 meses de idade. A taxa de morbidade é baixa (menos de 5%), mas surtos afetando uma porcentagem relativamente alta de animais, já foram relatados. A taxa de letalidade é próxima de 100% em diferentes faixas etárias (POTGIETER, 2004).

Os animais acometidos ficam deprimidos, anoréxicos e com sialorréia. Caracteriza-se ainda por hipertermia, sendo comum taquicardia e polipnéia (POTGIETER, 1995).

Existem duas formas de DM, a aguda e a crônica, que tem um curso mais prolongado (POTGIETER, 2004). A forma aguda da doença caracteriza-se por um período de incubação de 10 a 14 dias seguido de febre, anorexia, taquicardia, polipnéia, erosões na mucosa oral e nas narinas, desidratação e diarreia aquosa profusa, que pode ser acompanhada com estrias de sangue, coágulos de fibrina e odor fétido. Corrimento nasal e ocular, opacidade de córnea, sialorréia, redução da ruminação, timpanismo também são observados em animais doentes. Os bovinos infectados geralmente morrem dentro de poucos dias após o início da sintomatologia clínica (GROOMS, 2004; FLORES, 2007; RADOSTITS et al. 2007).

Os sinais clínicos da DM crônica são semelhantes aos da forma aguda, porém menos severos e seu curso é prolongado (até 18 meses). A DM geralmente afeta um ou poucos animais, e ocorre somente em animais PI. Nessa forma da doença podem ser detectados os dois biótipos do vírus, o citopatogênico e o não citopatogênico. Já a BVD aguda, pelo BVD-2, geralmente acomete vários animais do rebanho, e nesse caso apenas a cepa NCP é detectada. Logo, o isolamento da cepa CP pode ser considerado um marcador da DM (FLORES, 2003).

A doença é caracterizada por anorexia, emaciação progressiva, descargas óculo-nasais e diarreia contínua ou intermitente. Um inchaço crônico pode ser uma característica. Lesões de pele são comuns nos animais afetados cronicamente e normalmente se manifestam por áreas de alopecia e hiperqueratose ou eczema na região do pescoço, erosões crônicas na região perineal, vulva, abertura prepucial, junção da pele com o chifre, fendas interdigitais, talões e paradígitos. Anemia, neutropenia e linfopenia geralmente estão presentes e as infecções secundárias são comuns (POTGIETER, 2004).

3.6 Diagnostico

O diagnóstico clínico de BVD é feito com base na identificação da sintomatologia clínica e nos achados patológicos característicos da doença, porém devido à diversidade de manifestações sintomatológicas, o diagnóstico definitivo só pode ser realizado com o auxílio de testes laboratoriais (FINO et al, 2012).

Vários métodos podem ser empregados no diagnóstico da BVD, dentre eles o isolamento viral, vírus neutralização, o ensaio imunoenzimático (EIE) e a reação em cadeia de polimerase (PCR) (BROCK, 1995). Outras provas sorológicas também podem ser utilizadas como a fixação do complemento, imunofluorescência indireta e imunofluorescência anticomplemento (BARON et al., 1994).

O material a ser remetido depende da história clínica e do rebanho, se houver ou não a suspeita de infecções persistentes ou agudas, e a história de vacinação, necessária para interpretar a sorologia (RADOSTITS et al., 2002).

Segundo Cornish et al (2005), a biópsia de tecido cutâneo (orelha) fixada em formol é considerado material de escolha para diagnóstico do BVDV pela IHQ, sendo um método metuculoso e efetivo para detecção de bovinos infectados pelo BVDV, e eficiente técnica para diagnóstico de animais PI. Além de efetiva a técnica permite testar um grande número de bovinos, com rapidez e com tecido de fácil coleta.

Para Pilz et al. (2007), a técnica de RT-PCR em *pools* de soros sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarréia viral bovina possibilitou redução considerável tanto no custo do diagnóstico quanto no tempo necessário para a conclusão dos resultados.

Embora a técnica padrão para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BVDV seja a SN, outras técnicas têm sido avaliadas e utilizadas no país. Canal et al. (1998) relataram o desenvolvimento e a padronização de um teste ELISA para detecção de anticorpos contra o BVDV. O teste utiliza antígenos recombinantes produzidos em baculovírus e demonstrou sensibilidade de 97,6 % e especificidade de 99,4 % quando comparado com a SN. Paredes et al. (1999) avaliaram a capacidade de um teste de soroneutralização de diferenciar a resposta sorológica entre os diferentes pestivírus.

Kreutz et al. (2000) produziram dois anticorpos monoclonais (mAbs) contra antígenos de um isolado brasileiro de BVDV-1. Os mAbs foram capazes de reconhecer antígenos de mais de 50 isolados de campo de BVDV-1 e BVDV-2 em testes de imunofluorescência, demonstrando ser adequados para uso em diagnóstico.

Andrade et al. (2002) padronizaram a técnica de imunoperoxidase em monocamada de células para o diagnóstico do BVDV.

O isolamento viral é o teste diagnóstico de excelência e o método recomendado pela OIE em casos comércio internacional (OIE 2009). Para possibilitar uma boa confiabilidade do teste, as amostras devem ser coletadas de maneira asséptica e conservadas sob refrigeração, sendo que o material de escolha para envio deve ser fragmentos do fígado ou baço, mucosa do intestino delgado, linfonodos, sangue total ou soro e sêmen. Como o isolamento viral requer mais tempo para ser realizado, métodos diagnósticos como a imunohistoquímica e ELISA estão adquirindo importância por serem mais baratos, rápidos e apresentarem boa sensibilidade (FINO et al, 2012).

3.6.1. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Esta técnica descrita por Engval e Perlmann (1971), expressa pela sigla ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) é utilizada para a detecção de pequenas quantidades de antígenos/anticorpos, que geralmente não são detectáveis pelos métodos convencionais. Apresenta como característica a alta sensibilidade e especificidade, e rapidez na sua execução. Isso permite o estudo de grandes populações em curto espaço de tempo, e em laboratórios de rotina (DINTER, 1989).

A identificação de antígenos/anticorpos é baseada em reação enzima-substrato que produz mudança de cor. A leitura espectrofotométrica evita resultados subjetivos (DUBOVI, 1990). Demonstra boa concordância com os procedimentos de isolamento viral convencionais, sendo adequado para testes de atestado e diagnóstico de rotina (RADOSTITS et al., 2002). Tem como principal vantagem o fato de testar um grande número de amostras em pouco espaço de tempo. Porém, o ELISA também deve ser realizado em amostras biológicas (soro sangüíneo, plasma ou sangue total) individuais, o que aumenta o custo final do diagnóstico, podendo inclusive inviabilizar o seu uso em situações de rebanhos onde muitos animais devem ser avaliados (ROSSMANITH et al., 2001).

3.7 Impactos econômicos

As estimativas das perdas econômicas devido à infecção de BVDV são complexas e variam consoante o estado imunitário do rebanho, o estado de gestação das fêmeas no momento da infecção e a virulência da estirpe infectante (HOUE, 1999).

O impacto da infecção pelo BVDV em rebanhos leiteiros é rapidamente percebido pela redução da produção leiteira e pelo aumento da ocorrência de infecções secundárias ou oportunistas (BROCK, 2004; KOZASA *et al.*, 2005). As perdas devido a várias formas da infecção pelo BVDV incluem diminuição da produção de leite, diminuição da taxa de concepção, desordens respiratórias, entre outras (CANÁRIO et al., 2009).

A diminuição da produção leiteira causa perdas na ordem dos 10,7 euros por 1000 litros de leite em infecções médias e 19 euros por 1000 litros de leite em infecções graves (FOURICHON, et al, 2005).

Atualmente, as perdas reprodutivas são as consequências economicamente mais importantes associadas à infecção pelo BVDV (GROOMS, 2006). Assim, as perdas econômicas causadas pela introdução do BVDV em explorações de fêmeas gestantes susceptíveis são devidas aos abortos, defeitos congênitos, nati-mortos, aumento da mortalidade neonatal, crescimento retardado, performance reprodutiva subotimizada devido à infertilidade, mortes provocadas pela MD e pela eliminação precoce de animais PI. (RADOSTITS, 2000).

Nas vacarias de leite, em casos de surtos, os custos podem ascender aos 96€/vaca/ano. Por sua vez, nas explorações de carne as perdas podem atingir os 58€/ano/vaca

(GUNN et al, 2004). Contudo, uma fase de grandes perdas pode ocorrer quando se deixa as novilhas atingirem a idade de reprodução sem serem expostas à infecção ou vacinação (RADOSTITS, 2000).

De uma forma geral, as perdas em explorações gravemente afetadas, em níveis nacionais, variam entre os 10 e 40 milhões de dólares (7,1 e 28,4 milhões de euros) por exploração (HOUE, 1999; HOUE, 2003). Contudo, na maioria dos casos, os custos calculados apenas incluem as perdas diretas, como os abortos e a morte dos animais, não sendo incluídos os efeitos indiretos, como é o caso da diminuição da fertilidade em vacas e a imunossupressão em vitelos, aumentando do risco de adquirir outras doenças (GUNN, 2005, HOUE, 2003).

3.8 Situação da Diarréia Viral Bovina no Mundo

O BVDV tem distribuição mundial e a prevalência de anticorpos chega a atingir 70 a 80% dos animais e até 80% dos rebanhos na América do Norte e em alguns países europeus. Nesses países, que são livres de Febre Aftosa, o BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de numerosos estudos e de programas de controle e/ou erradicação durante décadas. (FLORES, 2005)

No Uruguai, no ano de 1982, em estudo sorológico realizado com 71 amostras de casos suspeitos de BVD detectou 66% das amostras positivas. Da mesma forma, em 1996, um outro estudo utilizando a técnica de ELISA para detecção de anticorpos no soro e no leite, mostrou uma prevalência de 65% (MAISONNAVE, 1998).

Farhad Safarpour Dehkordi (2011) demonstrou uma elevada presença do patógeno no Irã ao analisar fetos abortados de bovinos, ovinos, caprinos, búfalos e camelos. De um total de 2.173 fetos abortados, 347 (15,96%) mostraram-se positivos para a presença de vírus da diarréia viral bovina utilizando a técnica de ELISA e 402 (18,49%) pela utilização do RT-PCR. Os resultados também demonstraram que a técnica do RT-PCR é consideravelmente mais rápida e precisa que a técnica de ELISA para a identificação do BVDV.

Estudos demonstram que ambas as cepas de BVDV, tipo 1 e tipo 2, estão circulando no continente Europeu, podendo a prevalência variar consideravelmente em diferentes países, de 70 a 100%, mas podendo também ser menor que 40% (HOUE, 1995; PATON, 1995; HAMERS et al., 2002).

3.9 Situação da Diarréia Viral Bovina no Brasil

A infecção e as enfermidades associadas ao BVDV têm sido descritas no Brasil desde os anos 60. Diversos relatos sorológicos, clínico-patológicos e de isolamento do agente demonstram a ampla disseminação da infecção no rebanho bovino brasileiro.(FLORES, 2005)

Estudo sorológico realizado por Chaves et al (2010) na região amazônica maranhense revelou que 61,5% (n=246) das amostras analisadas apresentaram anticorpos contra o BVDV. Sendo que a regional de Açailândia obteve frequência de 80% (n=96) e a de Imperatriz 53,5% (n=150) de animais reagentes. Das 40 propriedades amostradas, 95% (n=38) apresentaram pelo menos um animal reagente ao BVDV, indicando que a infecção está amplamente distribuída na região estudada.

Em inquérito sorológico realizado por Quincozes, C. G. et al. (2007) sobre a infecção pelo BVDV no Rio Grande do Sul, 1.150 (66,32%) das 1.734 amostras analisadas foram positivas, indicando que a infecção ocorre com alta frequência nos rebanhos bovinos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí. Em 70 (82,35%) das 85 propriedades avaliadas foram encontrados animais reagentes. As taxas de positividade por propriedade variaram de 14,29% a 100%. Dentre os fatores de risco por eles avaliados, exploração mista, criação extensiva, realização de ordenha mecânica, uso de inseminação artificial ou de inseminação artificial associada à monta natural, uso de piquete de parição e ausência de assistência veterinária, apresentaram significância estatística ($P<0,05$) associada à soropositividade.

Dias et al (2010) pesquisando amostras de sangues de bezerros com idade entre 6 e 12 meses em 26 rebanhos bovinos, não vacinados contra o BVDV, localizados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, encontrou apenas dois animais persistentemente infectados (PI) pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) a partir de amostras obtidas nas colheitas pareadas provenientes de um rebanho localizado no Estado de Minas Gerais.

Lazzari et al.(2008) analisando amostras de soro sanguíneo em três tipos de sistema de exploração de bovinos diferentes (exploração leiteira, tecnificado e com animais de alto valor zootécnico; rebanho 2, de aptidão mista para produção de leite e carne, com tecnificação e características zootécnicas medianas; e rebanho 3, de bovinos de corte com regime extensivo, pouco tecnificado e constituído de animais com baixo valor zootécnico),

pela técnica da virusneutralização, em propriedades leiteiras localizadas nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo encontraram 57% de animais reagentes. Em todas as propriedades foram encontrados animais positivos demonstrando que a infecção pelo BVDV pode ser encontrada em qualquer tipo de rebanho, no entanto, as maiores ocorrências foram encontradas nos rebanhos mais simples e nas propriedades menos tecnificadas (97,14%).

Estudando a prevalência de anticorpos para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), em 207 amostras de soro de bovinos do entorno de Goiânia, Guimarães et al. (2001) encontraram 47,83% de bovinos positivos através do ensaio imunoenzimático (EIE) e 52,17% pela soroneutralização (SN). Considerando a reatividade dos soros em uma ou ambas as técnicas, a prevalência de anticorpos na região foi de 54,11%. Verificaram ainda que para os animais examinados, o índice de soropositividade para BVD, por propriedade, variou de 7,4% a 100%. Essa variação ocorreu tanto nas fazendas onde houve aquisição recente de animais, como naquelas que não receberam novos bovinos há mais de um ano. Isto mostra que a fonte de infecção, provavelmente, esteja dentro das próprias fazendas e não oriunda de animais recém-adquiridos.

Realizando o teste de soroneutralização em 3.533 amostras de soro sanguíneo de bovinos do Estado de Goiás, Brito et al (2010) obtiveram uma prevalência para o BVDV, em animais não vacinados, de 64,0% (784 amostras de soro) e de 88,3% nas propriedades. Dos municípios estudados, 226 (97,4%) apresentaram, pelo menos, um animal/rebanho soropositivo. Adicionalmente, em 960 amostras soronegativas para anticorpos contra o BVDV, foi realizada pesquisa do antígeno viral, visando estimar a frequência de animais persistentemente infectados (PI). A presença do antígeno viral foi detectada em quatro (0,4%) das amostras analisadas. Dentre os fatores de risco estudados, apenas a idade mostrou-se associada à soropositividade nos animais.

Pilz et al (2007), utilizando a técnica da RT-PCR para detecção do genoma do BVDV em *pools* de soros sanguíneos provenientes de um rebanho da região dos Campos Gerais do estado do Paraná, constituído por 226 animais, que apresentava distúrbios da reprodução, detectaram 11 vacas lactantes e 12 bezerros em amamentação positivos. Dentre estes, cinco bezerros persistentemente infectados (PI). Neste estudo, a utilização da RT-PCR em *pools* de soros sanguíneos demonstrou ser uma estratégia rápida de diagnóstico etiológico e de baixo custo tanto para a detecção de infecção aguda quanto de animais PI.

A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) também foi avaliada por Dezen et al (2013) utilizando a técnica RT-PCR em soro sanguíneo, em um rebanho bovino leiteiro de alta produção com histórico de problemas reprodutivos e de vacinação regular contra o BVDV. Os pesquisadores identificaram 27 animais transitoriamente infectados e três animais persistentemente infectados (PI). Também verificaram aumentos nos títulos de anticorpos neutralizantes em um período de quatro meses, indicando infecção ativa no rebanho. De acordo com os autores, a circulação viral no rebanho avaliado foi responsável pela expressão de sinais clínicos da esfera reprodutiva em animais com baixo título de anticorpos e consequente falha na proteção fetal assim, demonstraram também que o controle da infecção pelo BVDV apenas por meio da vacinação regular em rebanhos com animais PI pode não ser eficaz na profilaxia dessa virose.

Na bacia leiteira de Imperatriz – MA, Fonseca (2011) detectou anticorpos contra o BVDV em 67,14% das 280 amostras individuais de leite testadas pela técnica de ELISA e 100% das 28 amostras coletivas. Ressaltando que em cada propriedade estudada foram encontrados pelo menos quatro animais reagentes.

Já os resultados encontrados por Costa (2009), utilizando o método do ensaio imunoenzimático direto (ELISA), em bovinos leiteiros da mesma região (Bacia leiteira de Imperatriz), vão de encontro ao trabalho de Fonseca (2009), ao descrever uma frequência de 6,66% de animais positivos nos municípios de Lageado Novo, São João do Paraíso e Porto Franco.

Sousa (2009) utilizando a técnica de ELISA indireto para estimar a frequência de anticorpos contra o BVDV e o BoHV-1 na bacia leiteira da Ilha de São Luís, verificou positividade em 67,3% (n=105) das amostras de sangue coletadas de fêmeas bovinas para o BVDV e em 67,5% para o BoHV-1. Dentre os municípios estudados, as frequências para o BVDV foram de 46,15% (n=18) em Paço do Lumiar, 67,5% (n=27) em São Luís, 70% (n=28) em São José de Ribamar e 86,48% (n=32) no município de Raposa. A maior frequência foi encontrada nos animais da faixa etária entre três e sete anos (39,74%).

3.10 Tratamento

Não há nenhum tratamento eficaz para a infecção por BVDV, mas alguns casos são subclínicos e auto-limitantes. A prevenção e controle da doença é a forma mais eficaz de erradicar e impedir a reinfeção na exploração. Os programas de controle englobam medidas

de biossegurança e de vigilância estritas, com identificação e eliminação de animais PI e, em alguns casos, efetua-se adicionalmente a vacinação do efetivo contra o agente, com vacinas vivas modificadas ou vacinas inativadas, fornecendo algum grau de imunidade aos animais. Estão a ser desenvolvidos esforços para aumentar a proteção fetal através da vacinação (CANÁRIO, 2009).

3.11 Controle e prevenção

O controle da BVDV consiste de alguns pontos importantes, dentre eles: diagnóstico definitivo da doença, terapia médica específica e medicina preventiva (manejo e vacinação) (REBHUN, 2000), além de controle rígido de trânsito de animais na fazenda, da qualidade do sêmen utilizado na fazenda (livre de patógenos) e monitoramento por sorodiagnóstico (DEL FAVA et al., 2003).

O monitoramento das propriedades deve ser realizado periodicamente, utilizando-se de testes laboratoriais que permitam demonstrar a contínua ausência da circulação viral ou detectar precocemente a sua entrada, caso as medidas preventivas não sejam completamente eficazes (PACHECO, 2010).

Caso haja evidência da presença do vírus, todo o rebanho deve ser rastreado buscando-se eliminar os animais PI e posteriormente implantar programas de vacinação. Caso o rebanho não tenha tido contato com o vírus pode se optar por não vacinar e enfatizar as medidas de biossegurança, como uma quarentena mínima de 30 dias e testes em animais introduzidos, evitar contato com animais ou fômites de outros rebanhos, e certificar-se que doadores de sêmen e embriões sejam livres do vírus, assim como os meios de diluição ou transporte desses produtos (POTGIETER, 2004, apud FARIA, 2013).

Segundo Garoussi (2007), o sêmen é um importante veículo de disseminação viral e responsável pela diminuição das taxas de fertilização quando positivo para BVDV, consequentemente faz-se necessário o controle do status sanitário deste. Todos os animais soropositivos devem ser separados do restante e eliminados o mais breve possível.

De acordo com Radostits et al. 2007, uma importante estratégia para o controle da BVD é a vacinação de fêmeas algumas semanas antes do início da estação de monta, dessa maneira haveria tempo hábil para a formação de uma resposta imune consistente com produção de anticorpos.

3.11.1 Vacinas

A vacinação contra o BVDV tem sido utilizada com relativo sucesso para proteger animais da enfermidade clínica, reduzir a circulação de vírus e para tentar impedir a infecção fetal e a consequente produção de bezerros PI (Dubovi 1992).

Após o reconhecimento da importância da infecção pelo BVDV para a pecuária bovina, vacinas atenuadas e inativadas foram desenvolvidas e passaram a ser utilizadas para reduzir a gravidade da doença clínica e as perdas econômicas. No entanto, a grande variabilidade antigênica dos isolados de campo sempre representou um obstáculo para a obtenção de proteção cruzada contra o amplo espectro dos isolados (DUBOVI, 1992; VAN OIRSCHOT et al., 1999).

Mais de 150 vacinas, contendo o BVDV atenuado (vacinas vivas modificadas) ou inativado já foram licenciadas nos Estados Unidos. O uso de vacinas contra o BVDV no Brasil ainda é incipiente e é realizado de forma irregular nas diferentes regiões e sistemas de produção.

Em regiões onde a BVD é endêmica, a vacinação de rebanhos livres é altamente recomendada, pois diminui a possibilidade de surtos da doença que provocam sérias perdas econômicas para o produtor. De modo geral, preconiza-se a vacinação para rebanhos com sorologia positiva e/ou histórico de doença clínica ou reprodutiva compatível ou que já tenham comprovada circulação viral. Adicionalmente, esta prática também é indicada em criações com alta rotatividade de animais, propriedades onde são reunidos animais de diferentes procedências (confinamento e terminação de novilhos, por exemplo) ou que tenham constante anexação de animais como em rebanhos leiteiros (FLORES, 2003).

No Brasil, somente vacinas inativadas com adjuvantes oleosos ou hidróxido de alumínio estão disponíveis para a imunização contra BVDV. A grande vantagem desse tipo de imunógeno é a segurança de administração que ele propicia, principalmente no tocante à vacinação de animais prenhes, por não promoverem a infecção fetal a partir de vírus vacinal e não apresentar reversão de virulência. Geralmente, essas vacinas são associadas a vacinas para outros agentes infecciosos como o herpesvírus bovino-1, vírus da Parainfluenza-3 e vírus respiratório sincicial (BRSV). Vacinas inativadas geralmente induzem resposta sorológica

moderada e de curta duração. Por isso, para uma resposta adequada são aconselhadas revacinações periódicas (FLORES, 2003).

Outro ponto que merece destaque é a formulação das vacinas comercializadas no país, que têm como base cepas virais norte-americanas ou européias de BVDV tipo 1, antigenicamente diferentes das estirpes circulantes no território brasileiro. A tendência atual é que o genótipo 2 seja incluído nas formulações vacinais visando mitigar as falhas e o insucesso de programas de prevenção frequentemente relatados, já que há baixa reatividade sorológica entre amostras de BVDV-1 e BVDV-2 (VOGEL et al. 2002).

Nacionalmente, a comercialização de vacinas vivas (atenuadas ou modificadas) não é permitida, no entanto, estas são capazes de induzir uma resposta imune satisfatória e duradoura, que persiste, por mais de um ano após a vacinação. Algumas desvantagens como falhas vacinais por estocagem e acondicionamento equivocado do produto biológico, a possibilidade de reversão de virulência e surtos de DM pós-vacinais, transmissão viral via transplacentária e infecção fetal produzindo abortamentos ou teratogenia limitam o uso desse tipo de vacina, principalmente em fêmeas gestantes (BRUM et al, 2002).

3.11.2 Controle sem vacinação

Em rebanhos com sorologia negativa, e cujo ingresso de animais seja raro ou eventual, geralmente rebanhos extensivos de gado de corte, o controle da BVD sem vacinação é indicado. Também é indicado para rebanhos cujos parâmetros reprodutivos e clínicos não registrem eventos sugestivos da infecção pelo BVDV. Nesses rebanhos (sem animais PI, sem sorologia, sem sinais clínicos e reprodutivos sugestivos do BVDV) e que se deseje evitar a introdução da infecção sem vacinação, recomenda-se testar para vírus todo e qualquer animal antes de ingressar na propriedade (FINO et al, 2012).

Os resultados das análises antigênicas dos isolados brasileiros de BVDV e os testes realizados com as vacinas comerciais demonstram a necessidade de reformulação destas para se adequarem à realidade brasileira, proporcionando, então, uma imunidade eficaz e duradoura aos animais vacinados (Lima et al. 2004; Vogel et al. 2002 ; Botton et al. 1998, Flores et al. 2005; Flores 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Região

A pesquisa foi realizada na Regional de Codó (Figura 01), que está situada mesorregião Leste do Maranhão, ocupando uma área territorial de 10.066 km² (IBGE/2010). É constituída pelos municípios de Timbiras, Coroatá, Peritoro, Alto Alegre, São Mateus e Codó (AGED, 2014) e, de acordo com o IBGE (2011), abriga uma população estimada em 292.653 habitantes. O efetivo do rebanho bovino é de 221.938 cabeças, sendo 7.416 (3,3 %) de exploração leiteira (AGED, 2013), composta de animais mestiços da raça Holandesa.

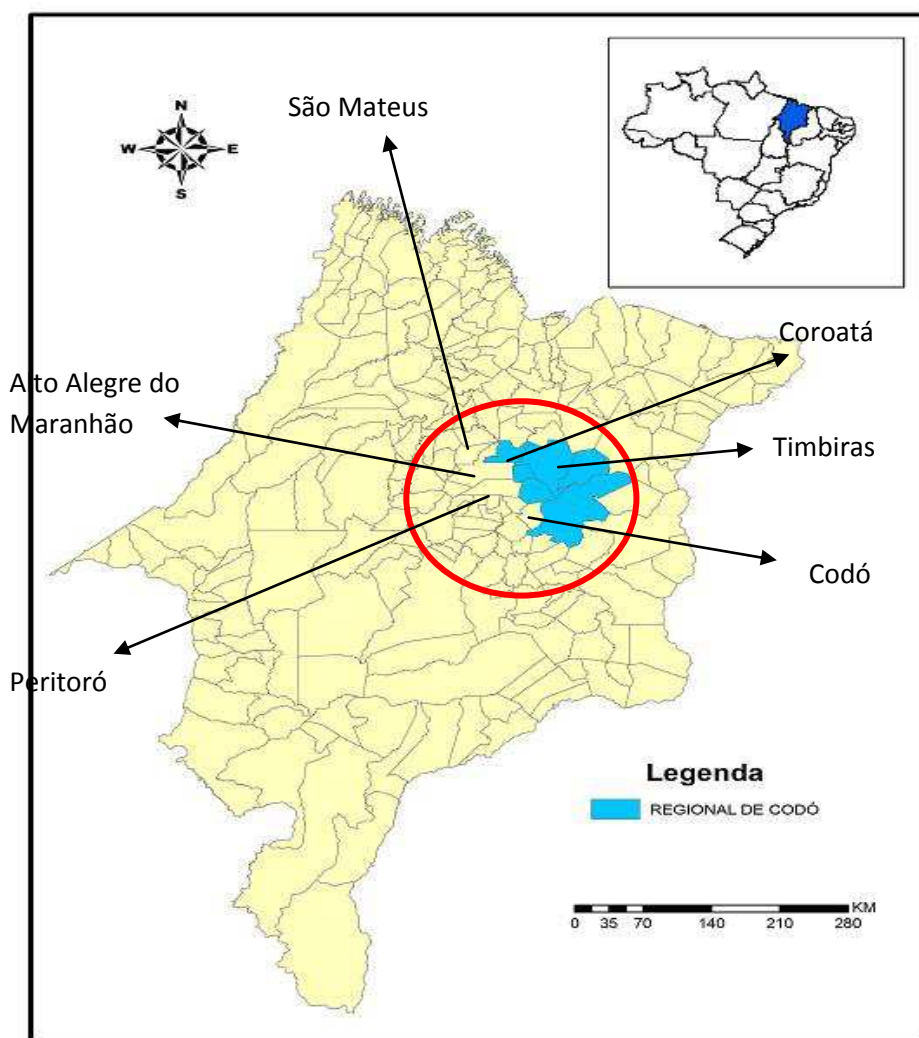


FIGURA 1. Mapa dos municípios que constituem a Regional de Codó.

4.2 Características do rebanho.

De acordo com a Agência Estadual de Defesa Agropecuária - AGED (2013), O rebanho leiteiro da Regional de Codó está distribuído em 42 propriedades, com uma média de produção estimada em 2,5 litros/ vaca/ dia (AGED, 2011).

Por ocasião da escolha dos rebanhos, alguns critérios foram considerados, como presença de bovinos não vacinados contra BVD, condições de manejo e nutrição semelhantes, regime de criação semi-intensivo e possuir animais nas faixas etárias demonstradas a seguir:

QUADRO 01. Quantidade de bovinos amostrados por rebanho na Região Centro-Leste do Maranhão – Brasil, 2014

FAIXA ETÁRIA	FÊMEAS	MACHOS	TOTAL
MENOS DE 03 ANOS	03	-	03
ENTRE 03 E 07 ANOS	06	-	06
ACIMA DE 07 ANOS	02	-	02
EM IDADE DE REPRODUÇÃO	-	01	01
TOTAL	11	01	12

4.3 Coleta de amostras

Para determinação do tamanho da amostra a ser coletada seguiu-se o método de cálculo descrito por Triola (1999), Callegari & Jacques (2007), onde utilizou-se a seguinte fórmula:

$$n_0 = \frac{1}{E_0^2}$$

$$n = \frac{N \cdot n_0}{N + n_0}$$

- N = tamanho da população
- E₀ = erro amostral tolerável
- n₀ = primeira aproximação do tamanho da amostra
- n = tamanho da amostra

Figura 02: Fórmula do cálculo amostral

Considerando um total de 42 rebanhos, um erro amostral de 5% e grau de confiança de 95 % obteve-se um $n = 38$. Distribuídos proporcionalmente em relação à quantidade de propriedades leiteiras de cada município obteve-se:

QUADRO 02: Número de rebanhos selecionados por município na Região Centro-Leste do Maranhão – Brasil, 2014

MUNICÍPIO	REBANHOS	REBANHOS
	EXISTENTES	TRABALHADOS
Alto Alegre do Maranhão	7	6
Codó	17	16
Coroatá	7	6
Peritoró	7	6
São Mateus	0	0
Timbiras	4	4
TOTAL	42	38

No entanto, no momento das visitas nas propriedades para a realização das coletas verificou-se que algumas explorações tinham sido extintas, por diversos motivos, o que reduziu o número de rebanhos trabalhados para 33, da seguinte forma:

QUADRO 03: Número de rebanhos selecionados por município na Região Centro-Leste do Maranhão – Brasil, 2014

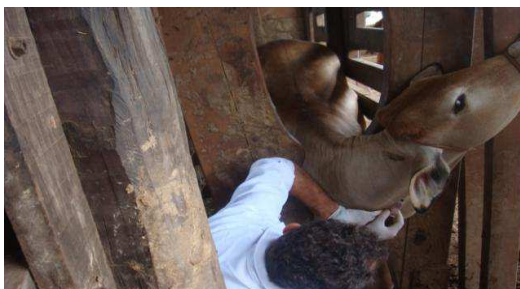
MUNICÍPIO	REBANHOS	REBANHOS
	EXISTENTES	TRABALHADOS
Alto Alegre do Maranhão	7	7
Codó	10	10
Coroatá	7	7
Peritoró	6	6
São Mateus	0	0
Timbiras	3	3
TOTAL	33	33

Em cada rebanho foram coletadas pelo método de amostragem aleatória simples, 12 amostras provenientes de bovinos de aptidão leiteira, estratificados da seguinte forma: três fêmeas (com idade inferior a 3 anos), seis fêmeas (com idade entre 3 e 7 anos), duas fêmeas com idade acima de 7 anos e um macho (reprodutor), apresentando ou não sinais clínicos da BVD, o que totalizou 396 amostras. O percentual de animais de cada faixa etária foi baseado

em dados do estudo de Brownlie (1990), que indicam que a prevalência é maior em animais adultos.

A permissão para a coleta das amostras foi adquirida mediante conversa prévia e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B) pelo produtor (ou responsável direto pelos animais). O presente instrumento consiste em um convite ao colaborador, esclarecendo pontos essenciais da pesquisa, como: título, importância do trabalho, objetivos e tipo de teste laboratorial a ser realizado. Informa ainda, que a participação na pesquisa é voluntária, que os resultados serão confidenciais e não trarão quaisquer prejuízos ao produtor, e apenas servirão para gerar dados estatísticos.

As coletas foram realizadas no período que compreendeu os meses de outubro de 2013 a junho de 2014. As amostras de sangue foram coletadas de bovinos leiteiros não vacinados contra a BVD, pela punção da veia jugular, com auxílio de agulhas tipo Vacutainer e tubos a vácuo (10 ml), esterilizados (Figuras 03 e 04). Utilizou-se o formulário de coleta de amostras (ANEXO A) para a identificação dos animais utilizados na pesquisa.



FIGURAS 03: Fotografia da punção da veia jugular de bovino.



FIGURA 04: Fotografia evidenciando o detalhe da punção da veia jugular de bovino utilizando tubos a vácuo.

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente em posição inclinada, até que ocorresse a coagulação, retração do coágulo e liberação do soro. Foram posteriormente acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável e levados para o escritório da AGED, onde foi realizada a centrifugação a 2.000 rpm por 15 minutos. As alíquotas de soro foram transferidas para ampolas do tipo Eppendorf e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, onde ficaram acondicionadas a uma temperatura de -20°C , até o momento de realização dos testes sorológicos. (Figura 05)



FIGURA 05: Fotografia do processo de coleta das amostras de sangue bovino, acondicionamento e centrifugação: (a) tubos vacutainer siliconizados com amostras de sangue total, (b) centrifugação das amostras de sangue, (c) tubos eppendorf contendo amostras de soro em duplicata.

4.4 Análise das amostras

A detecção qualitativa de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina foi realizada mediante a técnica de ELISA - indireto, conforme descrito por Chu et al. (1985) e Howard et al. (1985) utilizando-se o “Kit” comercial de ELISA IDEXX BVDV total Ab. Os testes foram realizados no Laboratório de Virologia da UEMA. A leitura espectrofotométrica das placas de ELISA foi realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA (Figuras 06e 07).

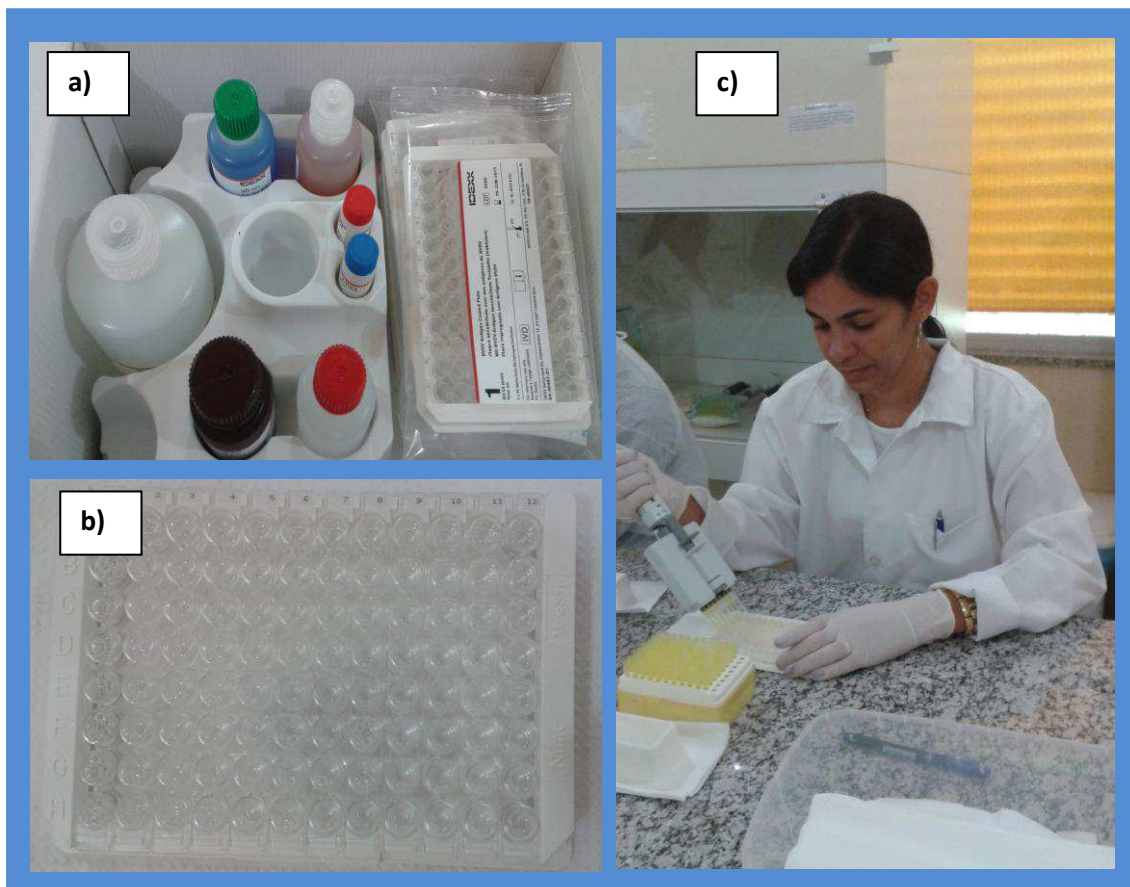


FIGURA 06. Fotografia do teste de ELISA-indireto, para identificação de anticorpos contra o BVDV: a) Kit” comercial de ELISA IDEXX BVDV Total Ab, b) Placa impregnada com antígeno BVDV, c) Adição de diluente de amostra para sensibilização das placas.

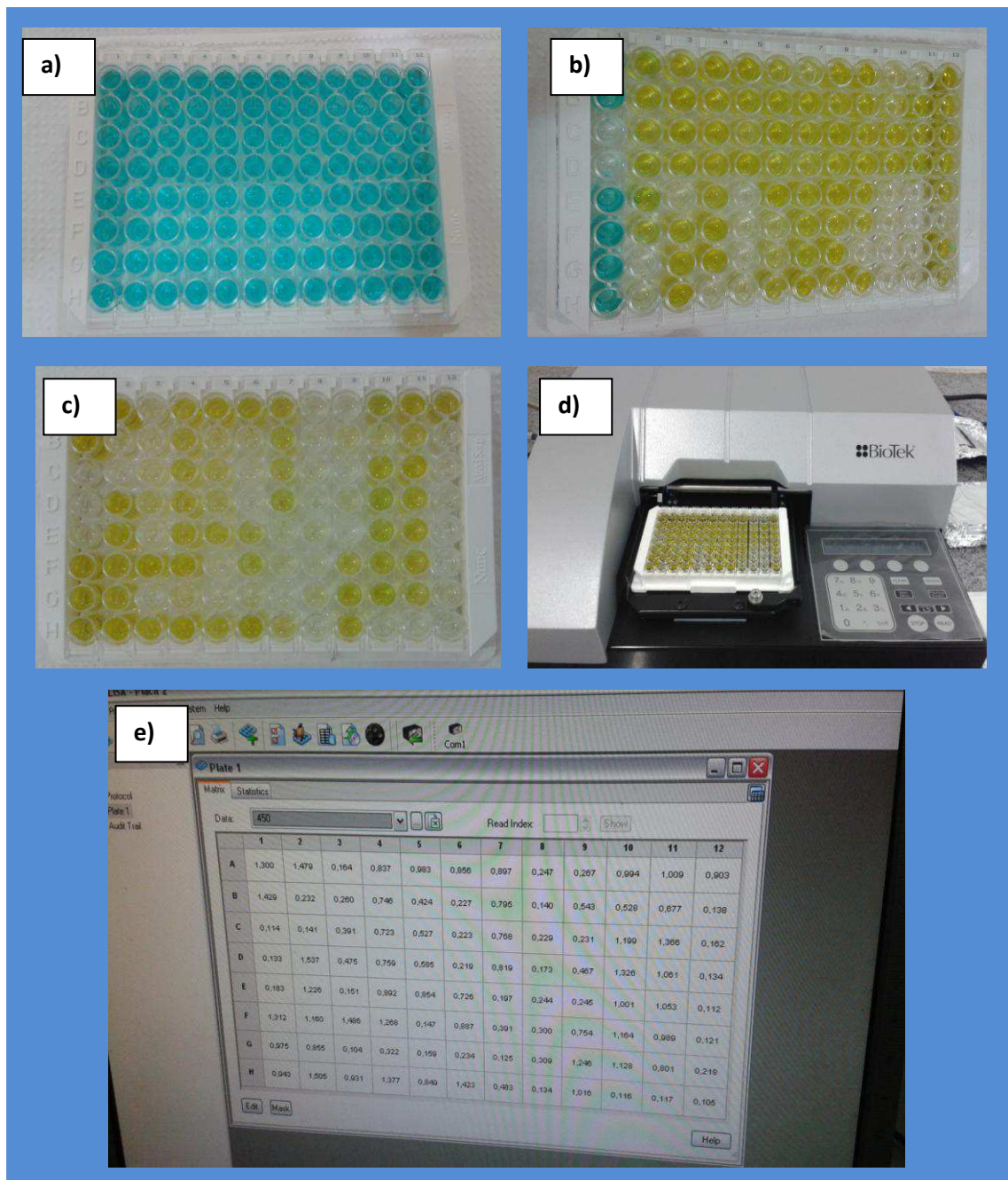


FIGURA 07. Fotografia do teste de ELISA-indireto, para identificação de anticorpos contra o BVDV: a) Placa com coloração azul após a adição do conjugado, b) Placa evidenciando a mudança de coloração do azul para amarelo após a adição do substrato, c) Placa após a adição de substrato e da solução de interrupção, d) Placa preparada para iniciar a leitura no espectrofotômetro, e) Resultado obtido após leitura da placa.

4.5 Fatores de risco

O estudo da associação de possíveis fatores de risco à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina foi feito através da aplicação de questionário epidemiológico (Anexo C) com o proprietário ou responsável pelo rebanho para obtenção de informações relacionadas às características do rebanho, sanidade, práticas de manejo e ocorrência de sinais clínicos sugestivos desta enfermidade. Os fatores de risco avaliados foram: faixa etária, aquisição frequente de animais tipo de ordenha, presença de caprinos/ovinos, assistência veterinária, presença de suínos, abortamento, retorno ao cio, esterilidade, intervalo entre cios, manejo reprodutivo e diarreia. Os dados foram tabulados e armazenados em planilhas do Excel para posterior análise.



FIGURAS 08 e 09: Aplicação de questionário epidemiológico para análise dos fatores de risco.

4.6 Análise estatística

A frequência foi determinada dividindo-se o número de amostras sorologicamente positivas pelo número total de amostras coletadas, utilizando-se análise estatística descritiva por meio de distribuições absoluta e relativa.

O cálculo da prevalência consistiu na razão da somatória do número de animais positivos e suspeitos multiplicados por 100 e dividido pelo número de animais testados.

Para o estudo da associação entre infecção e fatores de risco, empregou-se o teste exato de Fisher ou o teste Qui-quadrado de independência, quando as condições para o teste anterior não forem verificadas. O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5% (0,05), obtendo-se intervalos de confiança de 95%. Utilizou-se o programa Instat, versão 3.05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo demonstram que dos 33 rebanhos analisados da Região Centro-Leste do Maranhão, 90,91% (n=30) foram considerados reagentes ao vírus da diarreia viral bovina, por ter apresentado pelo menos uma das amostras de soro bovino testadas reagente para o ELISA indireto. (Tabela 01).

TABELA 01. Frequência de anticorpos contra o BVDV em rebanhos leiteiros de cinco municípios da Regional de Codó – MA

Municípios	Nº de REBANHO	Reagentes		Suspeitos		Não Reagentes	
		n	%	n	%	n	%
Codó	10	07	70,00	01	10,00	02	20,00
Timbiras	03	03	100,00	00	00,00	00	00,00
Coroatá	07	07	100,00	00	00,00	00	00,00
Peritoró	06	06	100,00	00	00,00	00	00,00
Alto Alegre	07	07	100,00	00	00,00	00	00,00
TOTAL	33	30	90,91	01	03,03	02	06,06

Com exceção do município de Codó, que se destacou por apresentar dois rebanhos com ausência de soropositividade e um com apenas um bovino suspeito, nos demais municípios, todos os rebanhos apresentaram pelo menos 01 animal reagente(Tabela 01).

Foi confirmada a presença de animais reagentes nos cinco municípios testados (Figuras 10, 11 e 12), com a positividade de amostras variando entre 0% (em três rebanhos do município de Codó) a 100% (em um rebanho do município de Peritoró). O número de amostras por município foi calculada de forma proporcional à representatividade frente ao rebanho total da regional, sendo que o município de Codó apresentou o menor percentual de amostras reagentes, 34,17 % (n= 41), enquanto que Peritoró apresentou o maior percentual, 83,33 % (n= 60) (Tabelas 02, 03, 04, 05, 06 e 07).

Esses resultados demonstram ampla distribuição do agente infeccioso na região estudada e corroboram com outros estudos realizados no Maranhão (CHAVES et al., 2010; FONSECA, 2011; SOUSA et al., 2013) que detectaram infecção pelo BVDV em 100% dos

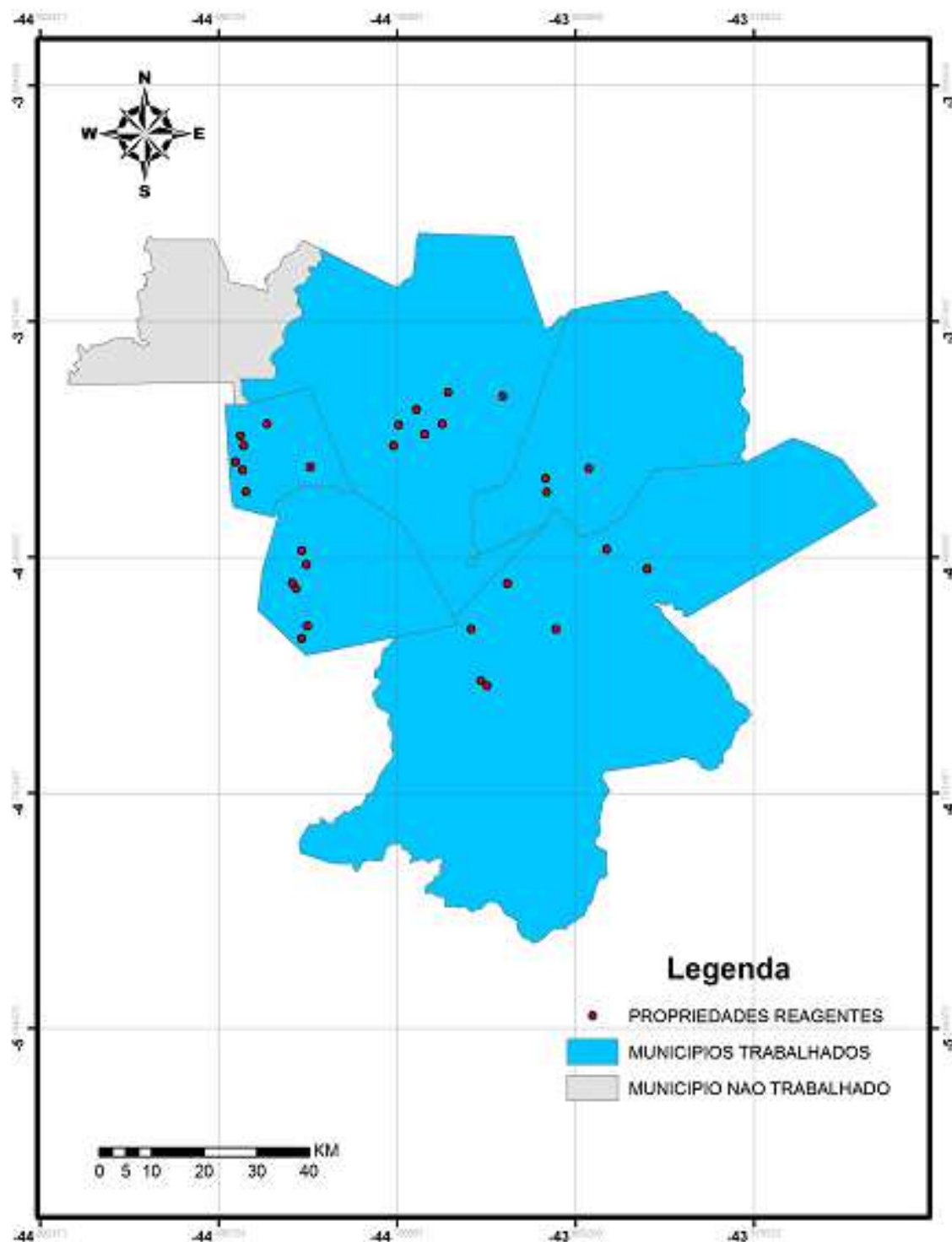


FIGURA 11: Mapa da distribuição das propriedades reagentes para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) na Regional de Codó.

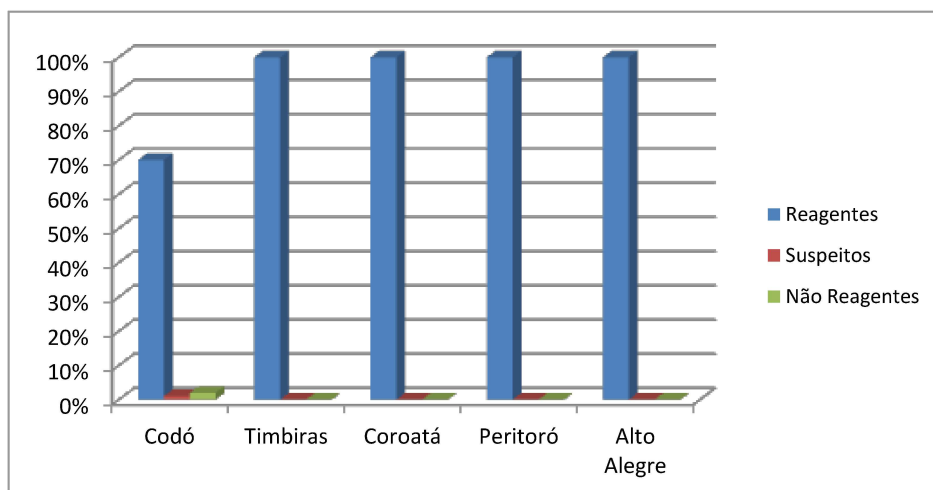


FIGURA 12. Gráfico da frequência de rebanhos reagentes para o Vírus da Diarréia Viral Bovina nos municípios pertencentes à Regional de Codó – MA – Brasil, 2014.

Das 396 amostras analisadas, 54,04% (n= 214) foram reagentes, 3,79% (n= 15) suspeitas e 42,17% (n=167) não reagentes (Tabela 02).

TABELA 02. Frequência de anticorpos contra o BVDV em bovinos leiteiros dos cinco municípios da Regional de Codó – MA

Municípios	Nº de amostras	Reagentes		Suspeitos		Não Reagentes	
		n	%	n	%	n	%
Codó	120	41	34,17	03	02,50	76	63,33
Timbiras	36	19	52,78	00	00,00	17	47,22
Coroatá	84	47	55,95	04	04,76	33	39,29
Peritoró	72	60	83,33	02	02,78	10	13,89
Alto Alegre	84	47	55,95	06	07,14	31	36,91
TOTAL	396	214	54,04	15	3,79	167	42,17

A frequência de 54,04% de bovinos reagentes para o BVDV encontrada no estudo está de acordo com os resultados encontrados por Guimarães et al. (2001) que obtiveram a frequência de 54,11%, em um total de 207 amostras de soro analisadas no entorno de Goiânia. No entanto, foi inferior aos descritos por Melo et al., (1997), no Estado do Sergipe, que variaram entre 58,23% e 71,18%; por Chaves et al. (2010), na bacia leiteira do estado do

Maranhão (65,66%) e Sousa et al. (2013), na bacia leiteira da Ilha de São Luís – MA (67,3%). Essa diferença observada pode ser consequência do tamanho da amostra, da técnica de diagnóstico utilizada, ou mesmo de peculiaridades regionais. Apesar das variações encontradas quando os resultados dos diversos autores são comparados, percebe-se que o BVDV está distribuído no Maranhão e em outros estados do território nacional em frequências preocupantes.

No Brasil, diversos estudos sorológicos têm sido realizados em várias regiões, demonstrando a ampla distribuição da infecção pelo BVDV no rebanho bovino (Flores et al., 2005; Quincozes et al., 2007).

TABELA 03. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Codó – MA, Brasil, 2014

Município	Nº do Rebanho	Nº de amostras	Reagentes		Não Reagentes		Suspeitos	
			n	%	n	%	n	%
CODÓ	1	12	0	00,00	12	100,00	0	00,00
	2	12	5	41,67	7	58,33	0	00,00
	3	12	9	75,00	3	25,00	0	00,00
	6	12	0	00,00	12	100,00	0	00,00
	7	12	1	08,33	10	83,33	1	08,33
	8	12	10	83,33	2	16,67	0	00,00
	14	12	9	75,00	3	25,00	0	00,00
	15	12	3	25,00	9	75,00	0	00,00
	32	12	0	00,00	11	91,67	1	08,33
	33	12	4	33,33	7	58,33	1	08,33
TOTAL		120	41	34,17	76	63,33	3	02,50

TABELA 04. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Timbiras – MA, Brasil, 2014

Município	Nº do Rebanho	Nº de amostras	Reagentes		Não Reagentes		Suspeitos	
			n	%	n	%	n	%
TIMBIRAS	4	12	3	25,00	9	75,00	0	00,00
	5	12	10	83,33	7	16,67	0	00,00
	10	12	6	50,00	6	50,00	0	00,00
TOTAL		36	19	52,78	17	47,22	0	00,00

TABELA 05. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Coroatá – MA, Brasil, 2014

Município	N° do Rebanho	N° de amostras	Reagentes		Não Reagentes		Suspeitos	
			n	%	n	%	n	%
COROATÁ	11	12	6	50	6	50	0	0
	24	12	1	08,33	10	83,33	1	08,33
	25	12	7	58,33	5	41,67	0	00,00
	26	12	11	91,67	1	08,33	0	00,00
	28	12	9	75,00	3	25,00	0	00,00
	29	12	6	50,00	5	41,67	1	08,33
	30	12	7	58,33	3	25,00	2	16,67
TOTAL		84	47	55,95	33	39,29	04	04,76

TABELA 06. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Peritoró – MA, Brasil, 2014

Município	N° do Rebanho	N° de amostras	Reagentes		Não Reagentes		Suspeitos	
			n	%	n	%	n	%
PERITORÓ	12	12	10	83,33	2	16,67	0	00,00
	21	12	11	91,67	1	08,33	0	00,00
	22	12	12	100,00	0	00,00	0	00,00
	23	12	7	58,33	5	41,67	0	00,00
	27	12	11	91,67	0	00,00	1	08,33
	35	12	9	75,00	2	16,67	1	08,33
TOTAL		72	60	83,33	10	13,89	02	02,78

TABELA 07. Frequência de bovinos leiteiros reagentes ao BVDV no município de Alto Alegre – MA

Município	N° do Rebanho	N° de amostras	Reagentes		Não Reagentes		Suspeitos	
			n	%	n	%	n	%
ALTO ALEGRE	16	12	9	75,00	3	25,00	0	00,00
	17	12	6	50,00	4	33,33	2	16,67
	18	12	6	50,00	5	41,67	1	08,33
	19	12	7	58,33	3	25,00	2	16,67
	20	12	8	66,67	4	33,33	0	00,00
	31	12	1	8,333	10	83,33	1	08,33
	34	12	10	83,33	2	16,67	0	00,00
TOTAL		84	47	55,95	31	36,91	6	07,14

Os resultados encontrados por município, quando comparados, mostram uma certa dispersão, onde o maior percentual de animais reagentes encontrado (83,33%) foi no município de Peritoró e o menor percentual (34,17%), no município de Codó, demonstrando que embora os municípios pertençam a uma mesma região, peculiaridades locais podem estar interferindo no aparecimento da enfermidade.

TABELA 08. Frequência de bovinos positivos para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), de acordo com a faixa etária, na Regional de Codó – Maranhão - Brasil, 2014

FAIXA ETÁRIA	Nº DE AMOSTRAS	REAGENTES		NÃO REAGENTES		SUSPEITOS	
		(M + F)	%	(M + F)	%	(M + F)	%
≤ 3	107	30	28,04	69	64,49	8	7,48
> 3 ≤ 7	221	137	61,99	79	35,75	5	2,26
> 7	68	47	69,12	19	27,94	2	2,94
TOTAL	396	214	54,04	167	42,17	15	3,79

Quanto à faixa etária, a análise geral (machos e fêmeas) das amostras demonstrou um percentual mais elevado de positividade (69,12%) nos bovinos com idade acima de 7 anos (Tabela 08).

Quando a análise foi feita apenas entre as fêmeas bovinas testadas, encontrou-se frequências de 27,55% (n = 27) para animais com idade até 3 anos, 63,64% (n = 126) para fêmeas entre 3 a 7 anos e de 67,16% (n = 45) nas acima de 7 anos, tendo sido, portanto, a faixa etária que apresentou o maior percentual de animais reagentes (Tabela 09).

TABELA 09. Frequência de fêmeas bovinas positivas para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), de acordo com a faixa etária, na regional de Codó – Maranhão - Brasil, 2014

FAIXA ETÁRIA	Nº DE AMOSTRAS	REAGENTES		NÃO REAGENTES		SUSPEITOS	
		N	%	N	%	N	%
≤ 3	99	27	27,55	65	66,33	7	7,14
> 3 ≤ 7	198	126	63,64	67	33,84	5	2,53
> 7	66	45	67,16	19	28,36	2	2,99
TOTAL	363	198	54,55	151	41,60	14	3,86

Notou-se que houve um crescimento no percentual de animais positivos à medida que aumentou a idade. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Castro et al. (1993) e Chaves et al. (2010) e, de acordo com Mainar-Jaime et al. (2001), são facilmente explicados, pois os animais mais velhos têm mais oportunidades de exposição ao agente e de induzirem a formação de anticorpos neutralizantes contra o BVDV, que persistem durante anos após a infecção. No entanto, diferem dos encontrados por Sousa et al (2013), que descreveram maior positividade entre fêmeas de 3 a 7 anos, e de Quincozes et al. (2007), que detectaram uma maior prevalência para a faixa etária de 07 a 12 meses, fato este que chama atenção se considerarmos os relatos de Coria & McClurkin (1978) que afirmam que, em alguns animais, anticorpos passivos podem persistir por até uma ano, podendo interferir nos resultados da pesquisa.

TABELA 10. Frequência de reprodutores bovinos positivos para o vírus da diarréia viral bovina (BVDV), de acordo com a faixa etária, na regional de Codó – Maranhão - Brasil, 2014

FAIXA ETÁRIA	Nº DE AMOSTRAS	REAGENTES		NÃO REAGENTES		SUSPEITOS	
		N	%	N	%	N	%
≤ 3 anos	8	3	37,5	4	50	1	12,5
> 3 ≤ 7 anos	23	11	47,83	12	52,17	0	0
> 7 anos	2	2	100	0	0	0	0
TOTAL	33	16	48,48	16	48,48	1	3,03

Dos 33 reprodutores, 48,48% (n=16) apresentaram resultado positivo, 3,03% (n=1) suspeito e 48,48% (n=16) negativo. A faixa etária que apresentou maior percentual de positividade, assim como nas fêmeas, foi a de animais com idade superior a 7 anos (Tabela 10 e figura 18), na qual 100% dos reprodutores testados reagiram positivamente ao teste.

Apesar da idade não ter sido avaliada como fator de risco para a infecção nos machos, quando os mesmos foram analisados separadamente, o aumento de positividade relacionado com o aumento na faixa etária também foi demonstrado no estudo.

A presença de machos positivos no rebanho pode refletir um importante dado epidemiológico quanto ao desempenho reprodutivo e aos prejuízos causados no rebanho pois, de acordo com Grooms (2004) reprodutores com infecções agudas apresentam uma queda na qualidade do sêmen (densidade e mobilidade reduzidas assim como aumento de anomalias morfológicas) apesar de estarem clinicamente saudáveis.

Analizando os fatores de risco (Tabela 11), apenas as variáveis faixa etária de fêmeas ($p=0,0001$) e presença de suínos ($p=0,05$) demonstraram associação estatisticamente positiva à infecção pelo BVDV. Os suínos são susceptíveis à infecção tanto natural quanto experimental pelo BVDV. É possível que esta espécie tenha um importante papel na epidemiologia dessa infecção (CELEDÓN et al., 2001; VOGEL et al., 2001; PESCADOR et al., 2004), pois possuem a habilidade de se tornarem infectados assintomaticamente. (SNOWDON, 1975; HARKNESS et al., 1978; DOYLE E GEUSCHELE, 1983).

Não houve associação estatisticamente positiva da infecção pelo BVDV com a variável abortamentos. Foram feitos relatos de apenas 12 (36,36%) das 33 propriedades do estudo com ocorrência desse sinal clínico. Este resultado, todavia, pode ter relação com respostas equivocadas durante a aplicação do questionário epidemiológico. Este dado não exclui a possibilidade de associação do BVDV a problemas reprodutivos, visto que ao avaliar o valor da razão de chance (OR), variáveis como abortamentos (OR=4,73), retorno ao cio (OR=2,61) e intervalo entre cios (OR=1,51) apresentaram valores elevados.

De acordo com os resultados também é possível afirmar que, em rebanhos que possuem animais apresentando diarreia (OR=3,20) e naqueles expostos à presença de caprinos (OR=1,16) as chances de infecção dos rebanhos pelo BVDV aumentam. De acordo com Nettleton (1987) é necessário considerar essa possibilidade, pois amostras de pestivirus isolados de bovinos podem infectar ovinos e suínos.

Observou-se que dentre os rebanhos reagentes, 75,76% realizavam ordenha manual ($n=25$), 66,66% ($n=22$) não possuíam assistência veterinária e em 33% ($n=11$) a espécie caprina era criada concomitantemente com os bovinos.

Chamou atenção o fato de que os rebanhos negativos do município de Codó são assistidos, ainda que de forma esporádica, por técnico de nível superior. Sugerindo que, mesmo a assistência veterinária não tendo sido considerada estatisticamente significativa como fator de risco para a infecção pelo BVDV, a importância dessa variável deve ser considerada na prática.

Esse resultado corrobora com o encontrado por Chaves et al (2010) que observaram frequências mais elevadas de infecção pelo BVDV (56,2%) em animais procedentes de propriedades que não possuíam assistência técnica em relação aos animais daquelas que possuíam (5,2%). Segundo os autores, a falta de assistência técnica pode refletir na ausência de diagnóstico e na ausência de programas adequados de controle da enfermidade.

Verificou-se ainda dentre os rebanhos estudados, que em 22 (66,67%) era utilizada a monta natural, em 3 (9,09%) a inseminação artificial e em 6 (18,18%) a monta natural associada à inseminação artificial como forma de manejo reprodutivo, sugerindo que a infecção pelo BVDV não está associada à inseminação artificial, o que vai de encontro a Weiblen (1992), que a descreve como forma de transmissão da doença. No entanto, corrobora com Fray et al. (2000), ao observarem que o sêmen de reprodutores cursando a forma aguda da doença pode se tornar fonte transitória de infecção.

A aquisição de animais de outras regiões ou estados não foi observada como uma prática frequente entre os produtores. Dos animais de propriedades que adquiriam animais da própria região observou-se positividade de 75,76%; dentre aqueles de propriedades que adquiriam animais do estado o percentual verificado foi de 6,06%, já entre bovinos oriundos de propriedades que adquiriam animais de outros estados encontrou-se 6,06%, demonstrando que a fonte de infecção dos bovinos, provavelmente, está presente na propriedade e não em outros estados. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados no Maranhão por Chaves et al. (2010) e Sousa (2009).

Levando-se em consideração as altas frequências demonstradas no estudo, é necessário que programas de controle e prevenção sejam implantados na região buscando reduzir gradativamente os índices de soropositividade dessa enfermidade. Tendo em vista a variabilidade genética do BVDV, que pode interferir na resposta imunológica do animal frente a um desafio de campo, é importante a continuidade da pesquisa, visando a caracterização das cepas virais encontradas no estado, para que dessa forma seja possível utilizar a vacina mais adequada para controlar a enfermidade.

TABELA 11. Resultado da análise dos fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarréia viral bovina em 33 rebanhos bovinos de aptidão leiteira na Regional de Codó – MA – Brasil

Variáveis		Reagentes		Não Reagentes		Total		OR	IC 95%	P
		N	%	N	%	N	%			
Faixa etária (anos)	≤ 3	32	32,32	67	67,68	99	27,27	33,27	-	0,0001**
	> 3 ≤ 7	129	65,15	69	34,85	198	54,55			
	> 7	45	68,18	21	31,82	66	18,18			
Aquisição de animais	Região	25	75,76	02	6,06	27	81,82	-	-	_**
	Estado	02	6,06	00	0	02	6,06			
	Outros Estados	04	6,06	00	0	04	12,12			
Tipo de ordenha	Mecânica	5	15,15	0	0,00	5	15,15	-	-	_**
	Manual	25	75,76	2	6,06	27	81,82			
	Ambas	1	3,03	0	0,00	1	3,03			
Presença de Caprinos /ovinos	Sim	11	33,33	1	3,03	12	36,36	1,16	0,09 a 14,30	1,00*
	Não	19	57,58	2	6,06	21	63,64			
Assistência veterinária	Sim	8	24,24	2	6,06	10	30,30	0,18	0,01 a 2,29	0,21*
	Não	22	66,67	1	3,03	23	69,70			
Presença de suínos	Sim	20	60,61	0	0,00	20	60,61	13,67	0,64 a 290,28	0,05*
	Não	10	30,30	3	9,09	13	39,39			
Abortamento	Sim	12	36,36	0	0,00	12	36,36	4,73	0,22 a 99,83	0,28*
	Não	18	54,55	3	9,09	21	63,64			
Retorno ao cio	Sim	17	51,52	1	3,03	18	54,55	2,61	0,21 a 32,09	0,58*
	Não	13	39,39	2	6,06	15	45,45			
Esterilidade	Sim	3	9,09	0	0,00	3	9,09	0,89	0,04 a 21,12	1,00*
	Não	27	81,82	3	9,09	30	90,91			
Intervalo entre cios	Sim	05	15,15	0	0,00	05	15,15	1,51	0,07 a 33,65	1,00*
	Não	25	75,76	3	9,09	28	84,85			
Manejo reprodutivo	MN	22	66,67	2	6,06	24	72,72	-	-	_**
	IA	3	9,09	0	0,00	3	9,09			
	MN+IA	6	18,18	0	0,00	6	18,18			
Diarréia	Sim	12	36,36	0	0,00	12	36,36	3,20	0,14 a 72,51	0,52*
	Não	19	57,58	2	6,06	21	63,64			

P < 0,05 – estatisticamente significativo
P > 0,05 – estatisticamente não significativo

*Teste de Fisher
**Teste Qui-quadrado

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados dessa pesquisa concluímos que:

- o BVDV está amplamente distribuído nos rebanhos de aptidão leiteira da Região centro-leste maranhense, com uma alta frequência, particularmente no município de Peritoró.

- a faixa etária de animais com idade superior a 7 anos foi a que mais apresentou animais reagentes.

- a presença de suínos constitui-se um fator de risco para transmissão do vírus. Porém abortamentos, retorno ao cio, intervalo entre cios, presença de caprinos e ovinos, e diarreia podem estar associados à infecção pelo BVDV.

É necessário uma maior atenção do sistema de defesa sanitária animal com relação à implantação de programas de profilaxia e controle que envolvam o diagnóstico, notificação de casos positivos, remoção de animais reagentes dos rebanhos, vacinação, vigilância epidemiológica e programas de educação sanitária voltados a essa enfermidade.

REFERÊNCIAS

- AGED-MA. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão. Disponível em: <<http://www.aged.ma.gov.br>>. Acesso em: 20 de Maio de 2014.
- AGED-MA. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão. **Relatório técnico mensal**. Codó - MA: julho, 2014.
- AGED-MA. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão. **Relatório técnico mensal**. Codó - MA: junho, 2013.
- ARAINGA R., MARILUZ et al. Fenotipo y genótipo Del vírus de La diarrea viral aislado de bovinos em el Peru. Ver. Ivestig. Vet. Perú, Lima, v.21, n.2, jul. 2010. Disponível em: http://www.sielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172010000200008&Ing es&nrm=isso. Acesso em: 15 de maio de 2014.
- ARENHART, S., SILVA, L. F., HENZEL, A., FERREIRA, R. Proteção fetal contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em vacas prenhes previamente imunizadas com uma vacina experimental atenuada. **Pesq. Vet. Bras.** Vol. 28, n.10, outubro 2008. p. 461-470.
- BAKER, J.C. Bovine viral diarrhea virus: A review. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 1987.p. 1449-1458.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.**, 11:425-445, 1995.
- BEER, J. Doenças Infecciosas em animais domésticos. São Paulo: Roca, 1999. p 89-93.
- BOLIN, S.R.; GROOMS, D.L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 2004. p.51-68.
- BOOKER, C. W. The effect of bovine viral diarrhea virus infections on health and performance of feedlot cattle. **CVJ**, VOL. 49, março 2008.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa Nº 50, de 24 de setembro de 2013. Alterar a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal e dá outras providências.

BRITO et al. Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (bvdv) no estado de Goiás, Brasil. **Revista de patologia tropical**, Vol. 39, n.1, p: 7-19. jan.-mar. 2010.

BROCK, K.V.; CHASE, C.C. Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines. **Vet Microbiol**, 2000, 77, p.209–214.

BROCK, K.; CORTESE, V. Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhea virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. **Vet Ther**, 2001, 2, p.354-360.

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

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

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

BROCK KV. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhea virus. **Vet Clin Food Anim**. 2004; 20:171-180.

BROWNLIE, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhea virus. **Vet. Microbiol**. 1990. p. 371-382.

BROWNLIE, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhea virus. **Vet. Microbiol**. 1990. p. 371-382.

BRUM, M. C. S. et al. Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas prenhes imunizadas com duas amostras de vírus atenuadas experimentalmente. **Pesq. Vet. Bras.**, Vol. 22, p: 64-72, 2002.

CALLEGARI-JACQUES S.M. Testes não-paramétricos, p.165-184. In: Callegari-Jacques S.M. (Ed.), **Bioestatística: Princípios e aplicações**. Artmed, Porto Alegre, 2003.

CANÁRIO, R., SIMÕES, J., MONTEIRO, M. H., MIRA, J.C. Diarreia Viral Bovina: uma afecção multifacetada. **Veterinaria.com.pt**, Vol. 1 Nº 2: e6. 2009; Disponível em: <http://www.veterinaria.com.pt>. Data de acesso: 07/05/2013.

CARMAN, S.; DREUMEL, T.V.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N.; Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario. **J. Vet. Diagn. Invest.** 1998,p.27-35.

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

CELEDÓN, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALFIO, R.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C. Pesquisa de anticorpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus em ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. **Arch. de Med. Vet**, v.33, n.2, p. 0-0, 2001.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P. PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1448-1451, jun, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000089>. Acesso em: 07/05/2013.

CHU, H. J. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus in bovine sera. **Vet. Microbiol.**, v. 10, p. 325-333, 1985

CORIA, M.F.; McCLURKIN, A.W. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **JAmVet Med Assoc**, 1978, 172, p.449–451, 1978.

CORNISH, T.E; VAN OLPHEEN, A.L.; CAVENDER, J.L; EDWARDS, J.M.; JAEGER, P.T; VIEYRA, L.L.; WOODARD, L.F.; MILLER, D.R.; O TOOLE, D. Comparison of notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **J. Vet. Diagn. Invest.** 2005. p.110-117.

CORREA, W.M.; NETTO, Z.C. & BARROS, H.M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, 35:141-151, 1968.

CORTESE, V.S.; GROOMS, D.L.; ELLIS, J.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; BROCK, K.V. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. **Am J Vet Res**, 1998, 59, p.1409–1413.

DEHKORDI, F. S. Prevalence study of Bovine viral diarrhea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine, Ovine, Caprine, Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran. **AMB Express**. 2011, Vol. 1, p.32. Disponível em: <http://www.amb-express.com/content/1/1/32> Acesso em: 12 de março de 2014.

DEREGT, D. Introduction and History. In: Goyal SM, Ridpath JF. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:3-33.

DEZEN, S., et al. Perfil da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesq. Vet. Bras.** 33(2):141-147, fevereiro 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n2/02.pdf>. Acesso em: 07/05/2013.

DIAS, Fabio C et al . Ocorrência de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarréia viral bovina em rebanhos bovinos nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 11, Nov. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010001100006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em : 28 de maio de 2014.

DIAS, F. C.; SÂMARA, S. I. Aspectos relevantes da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.1-9, jan./jun., 2010.

DOYLE, I. G.; GEUSCHELE, W. P. Bovine viral diarrhea infection in adaptive exotic ruminants. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.183, p. 1257-1259, 1983.

EVERMANN, J.F.; RIDPATH, J.F.; Clinical e epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. **Vet. Microbiol.**2002.p.129-139.

EVERMANN J.F; BARRINGTON G. Clinical Features. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:105-119.

FARIA, F. S. **Diarréia viral bovina: revisão de literatura e relato de casos.** Brasília, 2013. Disponível em: http://bdm.bce.unb.br/bitstream/10483/4781/6/2013_FelipedaSilvaFaria.pdf Acesso em: 07 de maio de 2013.

FINO, T. C. et al. Diarréia bovina a vírus (BVD) - uma breve revisão. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Vol. 34, n. 2, p:131-140, abr/jun 2012.

FLORES, E.F. *et al.* Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, vol.52, n.1, Fev. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352000000100003> Acesso em: 11/02/2014.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROCHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq Vet Bras**, vol. 25, n.3, 2005, p.125-134.

FLORES, E.F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**. Vol. 87, 2002, p: 51–60.

FONSECA, S. C. C. Frequência de anticorpos contra o virus da BVD (Diarréia Viral Bovina) no leite individual e de conjunto em tanque, de rebanhos não vacinados na bacia leiteira de Imperatriz, Maranhão – Brasil. 54f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual do Maranhão. São Luís – MA. 2011.

FOURICHON, C. et al. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. **Prev Vet Med**. 2005;72:177-181.

FRAY, M. D. et al. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.615-627, 2000.

FREDERIKSEN B., SANDVIK T., LOKEN T. & ODEGAARD S.A. Detection of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea vírus. **Vet. Pathol**. 1999, Vol. 36, p: 267-275.

FULTON, R. W. Multiple diagnostic tests to identify cattle with Bovine viral diarrhea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. 2009, Vol, 73, p: 117-124.

GIVENS, M. D., MARLEY, M. S. Immunology of chronic BVDV infections. **Biologicals** xxx. 2012, p: 1-5.

GOLLAN, A et al . Aislamiento y caracterización del virus de la diarrea viral bovina en un ternero con síndrome purpúrico. **Arch. med. vet.**, Valdivia , v. 38, n. 2, 2006. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200011&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 15 de maio de 2014.

GONDIM, A. C. L. O. **Diarréia viral bovina**. Monografia. (Programa de Pós-graduação "lato sensu" em Produção e Reprodução de Bovinos). Universidade Castelo Branco. Brasília. 2006.

GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management, and Control**, 1ª ed. 2005.

GROENS, D. Historical Evolution of our understanding of clinical and pathological manifestation of bovine viral diarrhea. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, 2002.

GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Vet. Clin. Food Anim. Pract.** 2004. p.5-19.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriog.** 2006. Vol.66, p:624-628.

GROOMS D., BAKER J.C., AMES T.R. Doenças causadas pelo vírus da diarréia viral bovina. In: Smith BP. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3ª ed. São Paulo, Brasil: Manole, 2006 p:707-714.

GUIMARÃES, P. L. S. N. et al. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina em bovinos, em regime de criação semi-extensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n. 1, p: 35-40, jan./jun. 2001.

GUNN, G.J, STOTT, A.W, HUMPHRY, R. W. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. **The Vet J**. 2004. Vol.167, p:143-149.

HANSEN, T. R. et al. Maternal and Fetal Response to Fetal Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. **American Journal of Reproductive Immunology**. Vol. 64, 2010, p: 295–306.

HARKNESS, J. W. ; SANDS, J. J. & RICHARDS, M. S. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. **Res. Vet. Sci.**, v.24, p. 98-103, 1978.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.362-365.

HORZINEK, M. C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Arch Viral.**, Suppl., v.3, p.1-5, 1991.

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

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

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea (BVDV) infections. **Vet Microbiol.** 1999; Vol. 64, p: 89-107.

HOUE, H. Economic impact of BVD infection in dairies. **Biologicals.** 2003. Vol.31, p:137-143.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.com.br>>. Acesso em: 26 março de 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.com.br>>. Acesso em: 26 de maio de 2014.

IGWEBUIKE, U.M. Trophoblast cells of ruminant placentas—A minireview. **Animal Reproduction Science**. Vol. 93, 2006, p: 185–198.

IMESC. Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. **Produto Interno Bruto dos Municípios do Estado do Maranhão: período 2006 a 2010**. São Luís: IMESC, 2012.

KIRKLAND, P.; McGOWAN, M.; MACKINTOSH, S. Factors influencing the development of persistent infection of cattle with pestivirus. **The 2nd symposium on pestiviruses**, Lyon, France, 1993, p.117–121.

LAZZARI, F. C., BARTHOLOMEI, L. F., PICCININ, A. Diarréia viral bovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008.

LIEBLER-TENORIO E.M. **Pathogenesis**. In: Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1^a ed. Oxford, ed: Blackwell Publishing, 2005:121-143.

LISS, B.; ORBAN, S.; FREY, H-R.; TRAUTWEIN, G.; WIEFEL, W.; BLINDOW, H. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90–229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). **Zentbl Vet Med B**, 1984, 31, p.669–681.

LIMA, M. de et al . Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, Mar. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2004000100009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 de maio de 2014.

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

LONERAGAN, G.H.; THOMSON, D.U.; MONTGOMERY, D.L.; MASON, G.L.; LARSON, R.L. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhea virus in feedlot cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 2005. p. 595-601.

M. KALE ET AL. Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection in Relation to Fertility in Heifers. **J. Vet. Med. Sci.**, Vol. 73, n. 3, p: 331–336, 2011.

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. **Prev Vet Med** 52: 63-73, 2001.

MAISONNAVE, J. Situacion de BVDV en Uruguay. In: Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino (Tipo 1 e 5) e Virus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p.67-68.

MARILUZ ARAÍNGA R., HERMELINDA RIVERA G., JUAN CARLOS HUAMÁN G., ALBERTO MANCHEGO. Fenotipo y genotipo del virus de la diarrea viral aislado de bovinos en el Perú phenotype and genotype of bovine viral diarrhoeavirus isolated in Peruvian cattle. **Rev. Inv. Vet.**, Vol. 21, n. 2. Perú: 2010. p- 192-203

MAYR, A; GUERREIRO, M.G. **Virologia veterinária**. 3 ed. Porto Alegre: Sulina, 1988. p. 350-354.

McCLURKIN, A.W.; LITTLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; Frank, G.H.; CORIA, M.F.; BOLIN, S.R. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. **Can J Comp Med**, 1984, 48, p.156–161.

MELO, C. B. OLIVEIRA, A. M. FIGUEIREDO, H. C. P. LEITE, R. C. LOBATO, Z. I. P. Prevalência de anticorpos contra herpesvírus bovino 1, vírus da diarréia bovina e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do Estado do Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 160-161, 1997.

MEYLING, A., JENSEN, A. M. Transmission of Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) by Artificial Insemination (AI) with Semen from a Persistently-infected Bull. **Veterinary Microbiology**, Vol. 17, 1988, p: 97-105.

NETTLETON, P.F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses. **Br. Vet. J.** 1995. p.615-642.

NETTLETON, P. F. Pathogenesis and epidemiology of Border Disease. **Ann. Research Vet.**, v18, p. 147 – 155, 1987.

OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009. Organização Mundial de Saúde Animal**. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 05 mai 2014.

OIE – World Organization for Animal Health. Chapter 2.4.8. – Bovine Viral Diarrhoea. In: Terrestrial Animal Health Code. **OIE Terrestrial Manual**. 2008:698-711.

PEDRERA, P. J. Respuesta inmunitaria en la diarrea vírica bovina. **Anales** - Vol. 21 (1) - Dic. 2008 - Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIR, D.; GONÇALVES, R. K.; CRUZ, C.E.F. Neurological disorder associated with pestivirus infection in sheep in Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p. 935-938, 2004.

PILZ, D. ALFIERI, LUNARDI, A. F., M., ALFIERI, A. A. RT-PCR em pools de soros sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.1, p.1-7, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000100001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 de maio de 2013.

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

POTGIETER, L.N.D. Immunology of BVDV. In: Bovine Viral Diarrhea virus. **Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract.**1995.p.501-520.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhea and mucosal disease, p.946-969. In: Coetzer J.A.W., Thomsom N.G.R. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious diseases of livestock*. 2nd ed., Oxford University Press, Cape Town, 2004.

QUINCOZES, C. G. et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 269-276, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/3439/2795>. Acesso em: 07 de maio de 2013.

RADOSTITS, O.M; GAY, C.; BLOOD.D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.974-993.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses**. 9ª ed. London, UK: W. B. Saunders, 2000:1085-1105.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C. & HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10th ed., Saunders-Elsevier, Edinburgh, 2007. 2156 p.

RIBEIRO, J.N.; PEREIRA, A. Aspectos da epidemiologia da infecção e persistência do vírus da diarreia viral bovina em explorações de bovinos leiteiros. **Rev Port Cienc Vet**. 2004;99:41-51.

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

RIVERA G., Hermelinda. Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarreia viral bovina y su agente etiológico. **Rev. investig. vet. Perú**, Lima, v. 19, n. 2, jul. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172008000200001&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 15 de maio de 2014.

RIBEIRO, J. N., PEREIRA A. Aspectos da epidemiologia da infecção e persistência do vírus da diarreia viral bovina em explorações de bovinos leiteiros. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 2004. V. 99, n.549, p. 41-51.

ROSSMANITH, W.; VILCEK, S.; WENZL, H. et al. Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. **Vet. Microbiol.**, v.81, p.207-218, 2001.

SAMARA, S.I.; DIAS, F.C.; MOREIRE, S.P.G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Braz. J. Res. Anim. Sci**. 2004.

SCHIMITZ, M. **Caracterização patológica e imunohistoquímica da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina**. 2006. Dissertação (Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária). Faculdade Federal do Rio Grande do Sul.

SMIRNOVAA, N. P. et al. Development of fetal and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhea virus. **Virus Research**. Vol. 167, 2012, p: 329– 336.

SNOWDON, W. A.; virus of bovine origin. J Comp. Path. , PARSONSON, I. M.;BRUNO, M, L. The reaction of pregnant to inoculation with mucosal disease virus of bovine origin. J. Comp. Path. v-85, p. 241-245.

SOUSA, V. E.; Bezerra, D. C.; Chaves, N. P.; Santos, H.P. & Pereira, H. M. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BOHV-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. **Rev. Bras. Med. Vet.**, 35(1):21-25, jan/mar 2013

TINSLEY, M. et al. Network modeling of BVD transmission. **Veterinary Research** 2012, p: 43:11. Disponível em: <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/11> Acesso em: 15 de março de 2014.

VIEIRA S., DIAS Fº F. C., QUEIRÓZ D. A. O., BRITO W. M. E. D. Seroepizootiological study on bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle from Goiás, Brazil. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. Anais X Encontro Nacional de Virologia, Curitiba, PR, 1999. p.58. (Resumo).

VILCEK, S., DURKOVIC, B., KOLESAROVA, M., PATON, D. J. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**. Vol. 72, 2005, p: 31–35.

VOGEL, F. S. F.; SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; LIMA, M.; KUNRATH, C. F. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 831-838, 2001.

VOEGEL et al. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV)1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.83-89, 2002.

WALZ, P.H. et al. Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in Ruminants. **J Vet Intern Med**. 2010, Vol. 24, p: 476–486.

WEIBLEN Rr. Doenças víricas que interferem na produção leiteira, p. 45 – 62. In: Charles T.P & Furlong J. (ed) **Doenças dos bovinos de leite adultos. Embrapa – CNPGL**, Coronel Pacheco, MG, 1992.

WIZIGMANN, G., VIDOR, T., RICCI, Z. M. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus - Enfermidade das mucosas dos bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Bolm Inst, Pesq. Vet. Desidério Finamor**, Porto Alegre, 1:52-58, 1989.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Folha para controle da distribuição de soro em placas de ELISA.

ANA RAYSA VERDE ABAS

Detecção de anticorpos e fatores de risco associados ao vírus da diarreia viral bovina (bvdv) em bovinos leiteiros na regional de Codó - MA – Brasil.

TESTE DE ELISA INDIRETO

PLACA Nº _____ – Regional de Codó (Municípios _____)

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>A</i>												
<i>B</i>												
<i>C</i>												
<i>D</i>												
<i>E</i>												
<i>F</i>												
<i>G</i>												
<i>H</i>												

Data: _____ / 07 / 2014.

APENDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Dados de identificação**

Título do Projeto: Soroprevalência e fatores de risco da diarreia viral bovina na regional de Codó – Maranhão – Brasil.

Pesquisador Responsável: Ana Raysa Verde Abas.

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Estadual do Maranhão – UEMA.

Telefones para contato: (99) 9137 - 2925 (99) 8405 – 6486.

Nome do colaborador: _____

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Soroprevalência e fatores de risco da diarreia viral bovina na regional de Codó – Maranhão – Brasil”, de responsabilidade do pesquisador Ana Raysa Verde Abas. Levando em consideração que a atividade leiteira tem um importante papel na sustentabilidade das propriedades agrícolas e que os ganhos de produtividade estão relacionados, basicamente, ao uso de tecnologias, genética, alimentação e à sanidade dos animais, e considerando que a Diarréia Viral Bovina (BVD) tem uma ampla distribuição e alta prevalência nos rebanhos com significativa repercussão econômica e sanitária, principalmente em rebanhos voltados à produção de leite, é que a presente pesquisa se propõe a avaliar a situação dessa enfermidade nos municípios que compõem a regional de Codó, no Estado do Maranhão, através de estudo soroepidemiológico que estimará a frequência de anticorpos contra o vírus da BVD nos bovinos leiteiros pertencentes a rebanhos da região. Além disso, os resultados possibilitarão identificar entre os bovinos, a faixa etária em que mais ocorre, assim como avaliar possíveis fatores de risco associados à infecção pelo vírus da BVD. Para a realização do trabalho serão utilizados kits comerciais de ELISA e dados serão coletados através de aplicação de questionário, assim como pelo método de observação. Para registro da situação encontrada poderão ser utilizadas fotografias, vídeos e cópias de entrevista gravadas. Não haverá para o colaborador nenhum desconforto, risco ou custo proveniente da pesquisa. Espera-se com a pesquisa obter dados relevantes que possam subsidiar os órgãos oficiais de defesa sanitária animal na execução de suas atividades para que, em consonância com a legislação sanitária vigente minimize os riscos de perdas econômicas atribuídas a essa enfermidade nos rebanhos, beneficiando assim, não somente quem está colaborando com a realização da pesquisa, mas a comunidade em geral. Salientamos que a sua participação é voluntária e que este consentimento poderá ser retirado a qualquer tempo, sem que haja para a sua pessoa quaisquer prejuízos. As informações geradas serão confidenciais, gerando apenas resultados estatísticos.

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Codó, ____ de _____ de _____

Nome e assinatura do voluntário ou seu
representante legal.

Nome e assinatura do responsável por
obter o consentimento.

Testemunha

Testemunha

ANEXOS

ANEXO A – Formulário de Coleta de amostras.

**SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À DIARRÉIA VIRAL
BOVINA NA REGIONAL DE CODÓ – MA.**

FORMULÁRIO DE COLETA DE AMOSTRAS

Nº DA PROPRIEDADE: _____ DATA DA COLETA ____/____/____

PROPRIEDADE: _____

PROPRIETÁRIO: _____

MUNICÍPIO: _____

Nº ORDEM	Nº DE SEQUENCIA	NOME (Nº) DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA	PELAGEM
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						

ANEXO B – Ficha cadastral da propriedade.

FICHA CADASTRAL DA PROPRIEDADE

FICHA Nº _____

Ficha Cadastral da Propriedade

Dados Gerais

Nome da Propriedade: _____

Bacia Leiteira: _____ Município: _____

Endereço: _____

Coordenadas Geográficas: Lat: _____ Long: _____

Nome do Proprietário: _____

Raça dos animais: _____ Pelagem: _____

Sistema de criação: _____

ANIMAIS								
Faixa etária	< 03 anos		> 03 e < 07 anos		> 07 anos		TOTAL	
Sexo	M	F	M	F	M	F	M	F
Quantidade								

ANEXO C – Formulário de inquérito epidemiológico.

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

FICHA Nº _____

Informações Epidemiológicas

1. Adquire animais com frequência? () Sim () Não
2. Aquisição de animais: () Região () Estado () Outros estados
 Procedência: _____
 Certificado Sanitário: () SIM () NÃO.
 Vacinas Exigidas: _____
 Idade: _____
3. Realiza quarentena? () Sim () Não
4. Assistência Veterinária? () Sim () Não
 Particular () Órgão fiscalizador () Outros () _____
5. Nº Ordenha/dia? _____ Nº animais dia? _____ () Mecânica () Manual
6. Produção/leite/dia: _____
7. Reprodução: () MN () MNC () MN+IA () IA () TE
8. Destino dos animais () Abate () Venda
9. Propriedades Vizinhas () Sim () Não
 Distância aproximada: _____
 Contato com os animais da propriedade vizinha? () Sim () Não
 Contato de fômites de propriedades vizinhas? () Sim () Não
10. Criação de suínos? () Sim () Não
11. Criação de caprinos/ovinos? () Sim () Não
12. Vacinação? () Sim () Não
 () Aftosa () Raiva () Clostridiose () Brucelose () Leptospirose () BVD
 () Outras vacinas: _____
 Periodicidade: _____

13. Vermifugação? () Sim () Não
- Periodicidade: () 1 X ao ano () 2 X ao ano () 3 X ao ano
Princípio ativo utilizado? _____
14. Ocorrência de doenças? () Sim () Não
15. Diagnósticadas? () Sim () Não
16. Sinais Clínicos:
- Digestivos? () Sim () Não
Quais?
- Reprodutivos? () Sim () Não
Quais?
- Eficiência reprodutiva () Retorno ao cio
() Aumento do intervalo entre cios
() Esterilidade
- Respiratórios? () Sim () Não
Quais?
- Neurológicos? () Sim () Não
Quais?
17. Sacrifício de animais? () Sim () Não

OBSERVAÇÕES:

ANEXO D. Descrição do Kit para detecção de anticorpos contra o Vírus da Diarréia Viral Bovina.

Versão em Português

Kit para Detecção de Anticorpos contra o Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)

Para uso exclusivamente veterinário.

Nome e Indicações

IDEXX BVDV Total Ab é um ensaio imunoenzimático da IDEXX para detecção de anticorpos contra BVDV em amostras de soro, plasma, leite individual e leite de tanque de expansão.

Informações gerais

O Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), o Vírus da Doença da Fronteira (BDV) e o Vírus da Cólera Suína (Vírus da Peste Suína Clássica, CSFV) são os três membros do gênero Pestivirus dentro da família Flaviviridae. O BVDV é um dos vírus patogênicos mais importantes para os bovinos, causando perdas consideráveis para as indústrias leiteiras e de carne em todo o mundo. Os sintomas típicos da infecção por BVDV são diarreia e febre seguidas por redução da produção de leite. O efeito imunossupressivo do BVDV pode potencializar a infecção por outros microrganismos. O vírus atravessa a placenta de vacas prenhes infectadas causando perdas reprodutivas devido a abortos, bezeros natimortos ou bezeros com mortalidade precoce. Alguns bezeros que sobrevivem são imunitolerantes e excretam grandes quantidades de vírus durante toda a sua vida. É importante identificar estes animais portadores para quebrar o ciclo da infecção nos rebanhos. Os animais portadores frequentemente morrem de "doença da mucosas" nos primeiros dois anos de vida. Como consequência da infecção intra-uterina, o BVDV é um contaminante frequente de produtos biológicos, como vacinas e medicamentos. O BDV causa doenças similares em ovelhas, enquanto o CSFV causa sérias perdas na indústria suína já que ele é altamente patogênico e pode causar mortes disseminadas. No entanto, todos os pestivirus podem ocorrer em bovinos também. Esse kit é somente para uso diagnóstico in vitro.

Descrição/Princípios

IDEXX BVDV Total Ab é um ensaio imunoenzimático indireto desenvolvido para detecção de anticorpos contra BVDV em amostras de soro, plasma e leite. Um formato de microstulação foi configurado através da impregnação do antígeno de BVDV nas placas. Os anticorpos do BVDV da amostra se aderem ao antígeno das placas. Após a incubação das amostras de teste nas cavidades, anticorpos de captura contra BVDV são detectados pelo conjugado anti-bovino. Depois o conjugado não aderido é lavado e uma solução de substrato/cromógeno é adicionada. Na presença da enzima, o substrato é convertido em um produto que reage com o cromógeno para gerar uma coloração azul. Após a adição da solução de interrupção, uma coloração amarela é gerada. A absorbância em comprimento de onda único de 450 nm ou um comprimento de onda duplo de 450 nm e 650 nm é medida usando-se um espectrofotômetro. A razão entre a amostra e o controle positivo é calculada usando-se a absorbância $A(450)$ ou $A(450/650)$ da amostra teste e do controle positivo, corrigida pela absorbância do controle negativo. O desenvolvimento da cor indica a presença de anticorpos contra BVDV na amostra teste (resultado positivo).

Reagentes

Armazene todos os reagentes entre 2-8°C.

Reagentes	Volume
1 Placa impregnada com Antígeno BVDV	5
2 Controle Positivo	1,0 ml
3 Controle Negativo	1,0 ml
4 Conjugado	60 ml
5 Diluente de Amostra	60 ml
A Substrato TMB No.12	60 ml
B Solução de Interrupção No.3	60 ml
C Concentrado de Lavagem (10X)	480 ml

NOTA: veja a labela na página 34 para descrição dos símbolos internacionais usados nos rótulos dos kits.

Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Centrífuga (capacidade 2000 xg)
- pipetas de precisão (de acordo com o "Protocolo de Teste", os volumes exigidos para os reagentes requerem pipeta com precisão de $\pm 5\%$)
- Pontas descartáveis para as pipetas
- Agitador de placas
- Água destilada ou água deionizada
- Lavadora de placa (manual, semi-automática ou automática)
- Tampa para placas (tampa plástica, papel alumínio, ou adesivo)
- Leitora de ELISA para placa de 96 orifícios equipada com filtro de 450 nm ou em duplo comprimento de onda de 450 nm e 620 nm
- Câmara Úmida / Incubadora capaz de manter uma temperatura de 37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)
- Agitador Vortex

Precauções e Advertências aos Usuários

- Não usar pipetar com a boca.
 - Usar luvas, avental, máscara para proteger o rosto e óculos protetores.
 - Controles, Substrato TMB e solução de lavagem podem causar irritação aos olhos.
 - Solução de Interrupção pode causar queimadura severa na pele e danos aos olhos.
 - Todos os resíduos devem ser descontaminados apropriadamente antes de serem descartados.
- Descarte o material conforme regulamentações locais, regionais e nacionais.

Procedimento dos reagentes**Solução de Lavagem**

O Concentrado de Lavagem (10X) deve ser trazido à 18-26°C e homogeneizada para permitir a dissolução de qualquer sal precipitado. O Concentrado de Lavagem a deve ser diluído 1:10 em água destilada ou deionizada antes do uso. Exemplo: 30 ml de concentrado mais 270 ml de água por placa a ser testada. Quando a Solução de Lavagem do é preparada em condições estéreis, pode ser armazenada durante uma semana a uma temperatura de 2°C até 8°C.

Procedimento das amostras

Soro fresco ou congelado, plasma ou leite podem ser testados. Amostras de leite total podem ser usadas após centrifugação por 15 minutos a 2000 x g ou deixadas "overnight" refrigeradas (2-8°C). Não é preciso um pré-tratamento para o leite desnatado.

ANEXO E. Protocolo do teste ELISA-indireto (IDEXX BVDV Total Ab)

Protocolo do teste

Todos os reagentes devem atingir 18–26°C antes do uso. Os reagentes devem ser homogeneizados por movimentos suaves ou por vórtex. Use uma ponteira diferente para cada amostra.

Amostras de soro ou plasma:

1. Obtenha placas impregnadas e anote a posição da amostra em uma folha de trabalho.
2. Adicione 100 µl de diluente de amostra em cada cavidade. Uma pipeta multicanal (8 ou 12 canais) pode ser usada para esse passo.
3. Adicione 25 µl de Controle negativo nas cavidades apropriadas.
4. Adicione 25 µl de controle positivo nas cavidades apropriadas.
5. Adicione 25 µl das amostras nas cavidades remanescentes. Use uma ponteira diferente para cada amostra. Continue no passo 6 da seção "Procedimentos comuns para amostras de soro, plasma e leite".

Amostras de leite:

1. Obtenha placas impregnadas e anote a posição da amostra em uma folha de trabalho.
2. Adicione 100 µl de diluente de amostra somente nas cavidades para controle negativo e para controle positivo.
3. Adicione 25 µl de Controle negativo nas cavidades apropriadas.
4. Adicione 25 µl de Controle positivo nas cavidades apropriadas.
5. Distribua 100 µl das amostras de leite não diluídas (e abaixo da camada de gordura) nas cavidades remanescentes da placa. Continue no passo 6 da seção "Procedimentos comuns para amostras de soro, plasma e leite".

Procedimentos comuns para amostras de soro, plasma e leite:

6. Homogenize o conteúdo das cavidades agitando levemente a placa ou usando um agitador para placas de microtitulação.
7. Incube por 90 minutos ($\pm$ 5 minutos) à 18–26°C ou "overnight" (12–18 horas) à 2–8°C. O protocolo "overnight" é recomendado para amostras de leite de tanque de expansão. Em qualquer opção de incubação, as placas devem ser seladas firmemente para evitar evaporação ou incubadas em câmara úmida.
8. Aspire o conteúdo líquido de todas as cavidades em reservatório apropriado.

9. Lave cada cavidade com aproximadamente 300 µl de Solução de Lavagem por 5 vezes. Aspire o conteúdo líquido de todas as cavidades após cada lavagem. Evite que a placa seque entre as lavagens e antes de adicionar o conjugado. Após a aspiração final, elimine o fluido de lavagem residual de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente.
10. Adicione 100 µl de Conjugado em cada cavidade.
11. Incube por 30 minutos (± 2 minutos) à 18–26°C.
12. Repita os passos 8 e 9.
13. Adicione 100 µl de Substrato TMB No.12 em cada cavidade.
14. Incube por 10 minutos (± 1 minuto) à 18–26°C no escuro. Comece a contar o tempo depois que a primeira cavidade for preenchida.
15. Adicione 100 µl de Solução de Interrupção No.3 em cada cavidade para parar a reação. Adicione a solução de interrupção na mesma ordem em que a solução de substrato foi adicionada no passo 13.
16. Calibre o espectrofotômetro com ar.
17. Meça e anote a absorbância das amostras e controles a 450 nm, ou em duplo comprimento de onda de 450 nm e 650 nm.
18. Calcule os resultados.

Resultados

Para que o teste seja válido, a diferença ($A - N$) entre a DO média do controle positivo ($CP\bar{x}$) e a DO média do controle negativo ($CN\bar{x}$) deve ser maior ou igual a 0,150. Além disso, a DO média do controle negativo ($CN\bar{x}$) deve ser menor ou igual a 0,250. Para testes inválidos, deve-se suspeitar da técnica e o teste deve ser repetido após a revisão cuidadosa da bula do produto. A presença ou ausência de anticorpos contra BVDV é determinada pelo cálculo da razão da amostra em relação ao controle positivo (A/P) para cada amostra.

Veja CÁLCULOS para exemplos.

Nota: IDEXX Laboratories, Inc. têm instrumentos e software disponíveis para o cálculo de razões das médias e razões A/P e elaboração de resumo de dados.

Cálculos

Média dos controles negativos ($CN\bar{x}$)	Média dos controles positivos ($CP\bar{x}$)	Amostra de teste
$CN\bar{x} = \frac{CN1 A_{450} + CN2 A_{450}}{2}$	$CP\bar{x} = \frac{CP1 A_{450} + CP2 A_{450}}{2}$	$A/P = \frac{\text{Amostra } A_{450} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$
Exemplo: $\frac{0,140 + 0,120}{2} = 0,130$	Exemplo: $\frac{1,380 + 1,400}{2} = 1,390$	Exemplo: DO amostra 1,075 $A/P = \frac{1,075 - 0,130}{1,390 - 0,130} = 0,750$

Interpretação de Resultados

Soro, plasma ou leite individual:

- Amostras com razão A/P menor que 0,20 são classificadas como negativas para BVDV Ac.
- Amostras com razão A/P maior ou igual a 0,20 mas menores que 0,30 são consideradas suspeitas. O animal deve ser retestado em poucas semanas.
- Amostras com razão A/P maior ou igual a 0,30 são classificadas como positivas para BVDV Ac.

Leite de tanque de expansão:

- Amostras com razão A/P menor que 0,20 são classificadas como negativas para BVDV Ac.
- Amostras com razão A/P maior ou igual a 0,20 são classificadas como positivas para BVDV Ac.

ANEXO F. Resumo do procedimento do teste ELISA-indireto (IDEXX BVDV Total Ab)

Etapa		Ação			
1.	Preparo e distribuição da amostra	Amostras de soro ou plasma: Obtenha as placas impregnadas e anote a posição da amostra em uma folha de trabalho. Adicione 100 µl de diluente de amostra em cada cavidade. Uma pipeta multicanal (8 ou 12 canais) pode ser usada para esse passo. Adicione 25 µl de Controle negativo nas cavidades apropriadas. Adicione 25 µl de controle positivo nas cavidades apropriadas. Adicione 25 µl das amostras nas cavidades remanescentes. Use uma ponteira diferente para cada amostra. Amostras de leite: Obtenha placas as impregnadas e anote a posição da amostra em uma folha de trabalho. Adicione 100 µl de diluente da amostra somente nas cavidades para controle negativo e para controle positivo. Adicione 25 µl de Controle negativo nas cavidades apropriadas. Adicione 25 µl de Controle positivo nas cavidades apropriadas. Distribua 100 µl de amostras de leite não diluídas (a abaixo da camada de gordura) nas cavidades remanescentes da placa. Homogenize o conteúdo das cavidades agitando levemente a placa ou usando um agitador para placas de microtitulação.			
2.	Incubação da amostra	Incube por 90 minutos (± 5 minutos) à 18–26°C ou “overnight” (12–18 horas) à 2–8°C (em um refrigerador). O protocolo “overnight” é recomendado para amostras de leite de tanque de expansão. Em qualquer opção de incubação as placas devem ser seladas firmemente para evitar evaporação ou incubadas em câmara úmida.			
3.	Lavagem da placa	Aspire o conteúdo líquido de todas as cavidades em um reservatório apropriado. Lave cada cavidade com aproximadamente 300 µl de Solução de Lavagem por 5 vezes. Aspire o conteúdo líquido de todas as cavidades após cada lavagem. Evite que a placa seque entre as lavagens e antes de adicionar o conjugado. Após a aspiração final, elimine o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente.			
4.	Distribuição do conjugado	Adicione 100 µl de Conjugado em cada cavidade.			
5.	Incubação do conjugado	Incube por 30 minutos (± 2 minutos) à 18–26°C.			
6.	Repita a etapa 3				
7.	Distribuição do substrato	Adicione 100 µl de Substrato TMB No.12 em cada cavidade.			
8.	Incubação do Substrato	Incube por 10 minutos (± 1 minuto) à 18–26°C no escuro. Comece a contar o tempo depois que a primeira cavidade for preenchida.			
9.	Interrupção da reação	Adicione 100 µl de Solução de interrupção No.3 em cada cavidade para parar a reação. Adicione a solução de interrupção na mesma ordem em que a Solução de substrato foi adicionada no passo 7.			
10.	Leitura da placa	Calibre o espectrofotômetro com ar. Meça e anote a absorbância das amostras e controles a 450 nm, ou em duplo comprimento de onda de 450 nm e 650 nm. Calcule os resultados.			
11.	Interpretação (A/P)	Soro, plasma ou leite individual	< 0,20	≥ 0,20 a < 0,30	> 0,30
			negativo	suspeito	positivo
		Leite de tanque de expansão	< 0,20		≥ 0,20
			negativo		positivo

ANEXO G. Estudos sorológicos da infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) realizados no Brasil (1971 - 2004).

Local	Ano	Técnica	n	Positivos	Procedência	Referência
Bahia	1987	SN	1.618	14,64%	Bovinos de várias regiões da BA	Ribeiro et al. 1987
Pernambuco	1994	SN	206	11,6%	Caprinos de PE	Castro et al. 1994
São Paulo	1995	ELISA	184	39,5%	ª	Langoni et al. 1995
Minas Gerais	1997	SN	287	61,47%	Bovinos de matadouros	Figueiredo et al. 1997
São Paulo	1997	ELISA	2.448	Ao lado	Amostras de vários estados: MG (65%), MS (84%), PR (67%), SP (78%), RS (73%), RJ (71%)	Richtzeinhain 1997
São Paulo	1997	SN	425	16,2%	Amostras de búfalas	Pituco et al. 1997
Rio Grande do Sul	1997	SN	1823	23,4%	Bovinos de 265 propriedades no RS	Krahl et al. 1997
Sergipe	1997	SN	102	64,7%	Bovinos de matadouros	Melo et al. 1997
Vários estados	1995-1997	SN	4.065	47,7%	Rebanhos com problemas reprodutivos de vários estados	Pituco & Del Fava 1998
São Paulo	1998	SN	493	40,8%	Touros de centrais de inseminação artificial (IA)	Pituco & Del Fava 1998
Rio Grande do Sul	1998	ELISA	430	56%	Bovinos de corte de 19 propriedades no RS	Canal et al. 1998
Vários estados	1999	ELISA	2.447	73,52%	56 propriedades de leite e corte dos estados do RS, PR, SP, RJ, MG e MS	Richtzenhain et al. 1999
Paraná	2001	SN	937	73,47%	Amostras de 81 rebanhos de corte e leite em 74 municípios do PR	Médici et al. 2000
Paraná	2001	SN	87	8,04%	Cervos do Pantanal desalojados pelo lago da represa Primavera, entre SP e MS	Alfieri 2004
Bahia	2000	SN	220	56%	Bovinos de 1 a 4 anos de diferentes regiões da BA	Noronha et al. 2001
Minas Gerais	2001	ELISA	ª -	58%, 61%	Dois rebanhos com problemas reprodutivos	Mineo et al. 2002
Goiás	2002	ELISA/SN	452	35,2%; 34,5%	Fêmeas bovinas (não-vacinadas) de rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos	Brito et al. 2002
Mato Grosso do Sul	2002	SN	60	ª	ª	Serra et al. 2002
Rio Grande do Sul	2003-2004	SN	697	58,8%	Amostras de 47 propriedades em 17 municípios da metade sul do RS	Vidor 2004
Goiás	2004	SN	160	63,7%	Touros na microrregião de Goiânia	Brito 2004
Goiás	2003	SN	3.533	64%	Fêmeas bovinas com mais de 24 meses de idade, estado de Goiás	Alfaia et al. 2004
São Paulo	1999-2004	SN	17.090	51,34%	Amostras de vários estados, testadas no LVB/IBSP	Pituco 2004
São Paulo	2003	SN	425	53,8%	Touros em sete centrais de IA no estado de São Paulo	Pituco 2004
Goiás	2000	ELISA/SN	207	54,1%	Bovinos de criação semi-extensiva do entorno de Goiânia	Brito 2004
Paraná	2000-2002	SN	5.711	61,98%	Amostras de vários estados: PR (61,5%), MT (68,4%), MS (74,5%), GO (61,4%), RO (67,1%), SP (54,3%), BA (65,8%)	Alfieri 2004
Rio Grande do Sul	1995-2004	SN	14.535	39,33%	Amostras de 1.264 propriedades de aproximadamente 100 municípios do RS	Weiblen 2004
Goiás	1999	ELISA	184	15,8%	ª	Brito 2004

ª Informação não disponível.

Fonte: Flores et al. (2005).