

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Vírus da diarreia viral bovina: detecção e aspectos epidemiológicos

Laura Lopes de Almeida

Porto Alegre, 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Vírus da diarreia viral bovina: detecção e aspectos epidemiológicos

Autor: Laura Lopes de Almeida

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção de grau de Doutor em
Ciências Veterinárias, especialidade
Virologia.

Orientador: Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE

2010

Laura Lopes de Almeida

Vírus da diarreia viral bovina: detecção e aspectos epidemiológicos

Aprovada em 26 FEV 2009.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Estêvão Farias da Cruz
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cláudio W. Canal pela confiança, orientação e amizade.

Ao professor Luís Gustavo Corbellini pela atenciosa orientação e incansável ajuda.

Ao professor David Driemeier pela generosidade e grande exemplo.

Aos professores Ana Paula Ravazzolo, Aoi Masuda, Carlos Termignoni, David Barcellos, Itabajara da Silva Vaz Junior, José Luiz Rodrigues, Laerte Ferreiro, Marisa Cardoso, Paulo M. Roehle e Sérgio Ceroni pelos exemplos, conselhos e auxílios ao longo de todos estes anos de agradável convívio.

Aos colegas dos Laboratórios de Embriologia, Imunologia e Biologia Molecular, Micologia, Medicina Veterinária Preventiva, Virologia, EPILAB e do Setor de Patologia Animal desta Faculdade pela disponibilidade dos materiais biológicos, reagentes, equipamentos, auxílios e troca de idéias.

À CAPES e ao CNPq cujos apoios financeiros tornaram possível a dedicação exclusiva e realização do trabalho.

A Clarissa, Edna, Fabrício, Josiane, Marisa e Nilzane pelo coleguismo, amizade e ensinamentos.

A Oremia pela amizade e pelos incontáveis favores ao longo de tanto tempo.

A Professora Valéria Moojen por despertar meu interesse pela Virologia e também pelo carinho e pela atenção sempre dispensados.

Muito especialmente a Carla, Fernanda e Adriana pela grande amizade, carinho e apoio incondicionais.

A minha família pelo amor, apoio e compreensão.

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um dos principais patógenos virais dos bovinos e sua infecção causa importantes perdas na produção dos rebanhos afetados. O presente trabalho contém os estudos realizados para esclarecer determinados aspectos da epidemiologia e da detecção da infecção causada pelo BVDV no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O primeiro artigo consistiu de um estudo transversal onde os níveis de anticorpos contra o BVDV em amostras de tanque de leite que foram correlacionados com os aspectos produtivos dos rebanhos. As amostras e as informações foram coletadas de 300 criações escolhidas aleatoriamente entre 1.656 associados de uma cooperativa de leite na região central do Estado do Rio Grande do Sul e que não utilizaram vacina contra BVDV nos últimos 12 meses anteriores ao experimento. Dessas, 80 foram consideradas positivas para BVDV pela detecção de anticorpos contra vírus em níveis superiores ao ponto de corte do teste de ELISA comercial utilizado. A prevalência aparente estimada foi de 26,7% e, usando um intervalo de confiança de 95%, apresentou uma variação entre 22 e 31%. Os parâmetros de produção mensal de leite, densidade de bovinos (relação vacas/hectare), tipo de armazenamento do leite e origem do sêmen não apresentaram associação com a infecção pelo BVDV, mas o aumento do número total de animais por rebanho foi correlacionado positivamente com a infecção. A prevalência estimada foi considerada baixa para uma população de rebanhos, criados em sistema semi-intensivo de produção de leite, que não usava medidas específicas de controle contra a infecção. A hipótese proposta no presente artigo é que o pequeno número de animais por rebanho está favorecendo a uma provável limpeza ou erradicação da infecção nas criações e que a prevalência encontrada deve corresponder ao ponto de equilíbrio entre a pressão de infecção e a limpeza da infecção destes rebanhos. A baixa prevalência estimada pode ser uma condição favorável para iniciar um programa de controle para BVDV na população estudada. No segundo artigo, um teste da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi estabelecido para detecção do vírus nas amostras de tanque de leite dos rebanhos suspeitos de infecção ativa pelo BVDV identificados no primeiro artigo. O teste foi capaz de detectar até 0,001 TCID₅₀ de BVDV por mL de leite. Esses resultados demonstraram uma sensibilidade analítica 100 ou 1000 vezes superior aos testes de RT-PCR convencionais descritos anteriormente para leite e são semelhantes aos resultados

obtidos em testes de RT-PCR em tempo real para BVDV. Na análise das amostras de campo, o teste detectou RNA viral em dois rebanhos entre os 59 analisados. Esses resultados comprovaram a capacidade do teste para identificar amostras naturalmente infectadas e a presença de vacas adultas produtivas e virêmicas em 3% dos rebanhos suspeitos de infecção. Este teste é uma alternativa rápida e sensível para monitorar a infecção pelo vírus em rebanhos leiteiros, a partir de amostras coletivas. O terceiro artigo tratou da detecção do BVDV em carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em bovino persistentemente infectado (PI). Seu objetivo foi investigar o papel do carrapato bovino *R. microplus* na transmissão do BVDV. O RNA viral foi detectado nas teleóginas alimentadas no bovino PI, mas não pode ser identificado em sua progênie (ovos e larvas). Esses resultados sugeriram não haver transmissão transovariana do BVDV nos carrapatos. Por outro lado, a infestação experimental de um segundo bovino com as larvas oriundas das teleóginas contaminadas com BVDV não resultou em manifestação clínica e o animal foi negativo no teste de RT-PCR. O experimento demonstrou que o carrapato *R. microplus* pode ser contaminado com BVDV durante o repasto sanguíneo, reforçando a idéia de que vetores hematófagos possam estar envolvidos na disseminação da doença e merecem mais investigações.

Palavras-chaves: BVDV, leite, ELISA, prevalência, RT-PCR, carrapato, *R. microplus*, transmissão.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is one of the main pathogenic agents in cattle and the infection with the agent causes important production losses in the affected herds. The present work contains studies carried out to clarify some aspects of the epidemiology and detection of the infection caused by BVDV in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The first paper consisted of a transversal study, where antibody levels against BVDV in samples of bulk milk tank were correlated with some aspects of milk production in the herds. Samples and information were collected from 300 herds randomly chosen between 1656 associates of a dairy cooperative in the region of the central area of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, that were not using routine vaccination against BVDV in the last 12 months previous to the experiment. Among them, 80 were considered positive to BVDV by detection of antibodies against the virus in levels above the cut off point of the commercial ELISA test used. The apparent estimated prevalence was 26.7% and, using a confidence interval of 95%, showed a range between 22 and 31%. The parameters of average milk production, bovine density (relationship cattle/hectare), milk storing process and origin of the semen were not significantly associated with BVDV infection, but the increase in the total number of cows in the herds was positively correlated with the infection. The prevalence was considered low for a population of herds raised in a semi-intensive milk production system that was not using specific measures to control the viral infection. The hypothesis proposed in the present study is that the small number of animals present in the analyzed herds would favor a likely virus clearance in the herd and that the prevalence found would correspond to a point of balance between the pressure of infection and the virus clearance. The low prevalence detected can be a favorable condition to launch a control program for BVDV in the studied population. In the second paper, a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was established for BVDV detection in bulk tank milk samples of the herds suspected of active infection with BVDV in the first paper. The test detected up to 0.001 TCID₅₀ of BVDV per mL of milk. These results demonstrated an analytical sensitivity 100 to 1000 times higher than conventional RT-PCR tests described previously for milk and are similar to results obtained by the use of real time RT-PCR already published. In the analysis of field samples, the test detected viral RNA in 2 out of 59 analyzed herds. These results demonstrated the relationship between the ability of the test to identify

samples naturally infected and the presence of viremic adult cows in 3% of the herds suspected of the infection. This test represents a fast and sensitive alternative for monitoring virus infection in dairy herds, through the analysis of collective samples. The third article dealt with the detection of BVDV in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fed in a bovine persistently infected (PI). The objective was to investigate the role of the cattle tick *R. microplus* in the transmission of BVDV. Viral RNA was detected in adult females fed on the PI bovine, but could not be identified in its progeny (eggs and larvae). These results suggest that there is no transovarial transmission of BVDV in ticks. On the other side, experimental infestation of a second bovine with larvae derived from adult cattle contaminated with BVDV did not result in clinical manifestations and the animal was negative in the RT-PCR test. The study demonstrated that the tick *R. microplus* can be contaminated with BVDV during blood feeding, strengthening the idea that haematophagous vectors could be involved in the dissemination of the disease and would deserve further consideration.

Key words: BVDV, milk, ELISA, prevalence, RT-PCR, *R. microplus*, transmission.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| SUMÁRIO | 9 |
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 REBANHO BOVINO BRASILEIRO | 11 |
| 2.2 POPULAÇÃO ALVO | 16 |
| 2.3 VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA | 17 |
| 2.4 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS PESTIVÍRUS | 18 |
| 2.5 DIVERSIDADE DO BVDV | 20 |
| 2.6 BIOTIPOS VIRAIS | 21 |
| 2.7 TIPOS DE INFECÇÕES CAUSADAS PELO BVDV | 22 |
| 2.8 FORMAS DA DOENÇA | 23 |
| 2.9 DIAGNÓSTICO | 25 |
| 2.10 EPIDEMIOLOGIA | 29 |
| 2.11 BVDV NO BRASIL | 32 |
| 2.12 CONTROLE E ERRADICAÇÃO | 34 |
| 2.13 CARRAPATO BOVINO | 35 |
| 3 ARTIGOS CIENTÍFICOS | 37 |
| 3.1 HERD-LEVEL ELISA PREVALENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA ANTIBODIES IN BULK TANK MILK OF DAIRY HERDS IN SOUTHERN BRAZIL | 38 |
| 3.2 ESTABELECIMENTO DE TESTE DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR) PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM AMOSTRAS DE TANQUE DE LEITE | 52 |
| 3.3 DETECÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA EM CARRAPATOS <i>RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS</i> ALIMENTADOS EM BOVINO persistentemente infectado | 59 |
| 4 DISCUSSÃO GERAL | 70 |
| 5 CONCLUSÕES GERAIS | 78 |
| REFERÊNCIAS | 79 |
| ANEXO 1 | 95 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante produtor mundial de alimentos e o agronegócio é um dos principais segmentos da economia nacional. O País possui o maior rebanho comercial e é o maior exportador de carne bovina do mundo. O setor tem apresentado avanços nos índices de produtividade principalmente pelos investimentos em nutrição e melhoramento genético, já quanto à sanidade, pode avançar muito mais. Atualmente estão em vigência os Planos Nacionais de Controle e Erradicação de Tuberculose e Brucelose, Febre Aftosa e Encefalopatias Espongiformes dos bovinos, e outras doenças importantes ainda não possuem um controle organizado. O conceito de rastreabilidade ainda é recente e vem sendo implantado lentamente. Estas melhorias aconteceram principalmente para atender as exigências específicas do comércio internacional (ABIEC, 2009; BRASIL, 2009).

A bovinocultura de leite abastece o mercado interno e também vem apresentando constante crescimento. A produção brasileira é a sexta maior do mundo, aumentou 40% nos últimos 10 anos, passando de 18,7 bilhões de litros em 1997 para 26,1 bilhões em 2007. Os três estados com maior produção do País são Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná. O Brasil pode melhorar sua produção de leite porque possui disponibilidade de terra, água, tecnologia e custo de produção competitivo no mercado internacional, tendo potencial para ser um grande produtor de leite no cenário internacional (EMBRAPA, 2009).

Doenças virais são preocupações constantes em qualquer programa de sanidade bovina e o diagnóstico depende do conhecimento da epidemiologia de cada doença e da utilização das técnicas laboratoriais adequadas para sua identificação.

O vírus da diarreia viral bovina (“bovine viral diarrhea virus”, BVDV) é um dos principais patógenos virais dos bovinos. A infecção causada por ele é predominantemente subclínica, mas pode ser reconhecida em rebanhos com boa condição nutricional que apresentem desempenho reprodutivo diminuído. Por outro lado, rebanhos não imunes recentemente infectados pelo vírus podem demonstrar formas agudas e até severas da doença que pode causar morte. Os sinais clínicos podem ser tão inespecíficos como febre, diarreias e queda de produção de leite ou mais evidentes, como erosões nas mucosas do aparelho digestivo, malformações congênitas e abortos. Entre as principais características do BVDV, destacam-se a sua diversidade e a

capacidade de estabelecer infecção persistente. Nos rebanhos afetados a infecção induz soroconversão prolongada e os animais virêmicos são raros, essas características tornam o diagnóstico complexo e geralmente exigem a associação de diferentes provas laboratoriais.

A infecção está disseminada mundialmente e vem sendo descrita no Brasil desde 1968. Ao longo desses anos já foram realizados importantes estudos envolvendo sorologia, isolamento, caracterização antigênica e genética dos vírus relacionados aos casos clínicos. A forma subclínica foi menos estudada e aspectos epidemiológicos, como prevalência e estudos de fatores de risco da doença nos diferentes tipos de criações são ainda escassos no Brasil e no Rio Grande do Sul (RS). As campanhas de controle e erradicação do BVDV, iniciadas na década de noventa nos países escandinavos, demonstraram a viabilidade do controle sistemático desta importante infecção, mas a sua implantação depende do conhecimento da epidemiologia da doença na região. No Brasil, ainda não são empregadas medidas de controle e erradicação do BVDV de forma organizada e vários aspectos da sua epidemiologia permanecem indeterminados.

Os objetivos da Tese foram: 1) estimar a prevalência da infecção pelo BVDV em rebanhos leiteiros utilizando amostra de tanque de leite para detecção de anticorpos, 2) estabelecer um teste de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) sensível para detecção do BVDV em amostras de tanque de leite em rebanhos, e 3) avaliar o papel do carrapato *R. microplus* na transmissão do BVDV sob condições experimentais.

A seguir, alguns aspectos do hospedeiro, do agente, da infecção e do carrapato bovino serão resumidos com a finalidade de apresentar uma fundamentação teórica para o entendimento dos experimentos que compõem essa Tese.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Rebanho bovino brasileiro

Segundo os dados parciais do último Censo Agropecuário, o Brasil possuía 169.900.049 bovinos distribuídos em 2.650.596 estabelecimentos rurais e apresentava diferentes densidades animais por região (IBGE, 2006), conforme demonstra a Figura 1.



Figura 1. Densidade de bovinos por km² em área territorial brasileira em 2006 (IBGE, 2006).

As criações brasileiras são predominantemente extensivas com alimentação baseada em pastagem natural. Nos estabelecimentos com mais de 50 cabeças de gado, a principal finalidade da criação é corte (81%), seguida de leite (16%). Os estabelecimentos com menos de 500 hectares de pastagem detinham 46% do rebanho. O sistema intensivo (confinamento) é utilizado para terminação de bovinos e nesses, os animais são alimentados com grãos e volumosos, sendo proibido o uso de proteína de origem animal, exceto produtos lácteos (IBGE, 2006; ABIEC, 2009; BRASIL, 2009).

Em 2008, o Brasil foi o maior exportador mundial de carne bovina. O segmento de gado de corte apresenta grande heterogeneidade, existindo desde pecuaristas altamente capitalizados até pequenos produtores, também frigoríficos com alto padrão tecnológico, capazes de atender à exigente demanda externa, até abatedouros que preenchem somente os requisitos mínimos da legislação sanitária. Entende-se que, para transformar a carne brasileira em um produto destacado, com valor agregado, precisasse melhorar as práticas de manejo, a sanidade e a organização da cadeia produtiva (ABIEC, 2009).

Quanto à genética, o rebanho brasileiro é composto por aproximadamente 80% de animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e de 20% de raças taurinas (*Bos taurus taurus*). O nelore é a principal raça zebuína e está distribuído em todo território

nacional. As raças taurinas estão concentradas na Região Sul do País onde o clima é subtropical. Os taurinos de médio porte apresentam precocidade sexual e carne com excelente acabamento de carcaça. Hereford e Angus são as principais raças taurinas britânicas criadas no Brasil e especialmente no RS. Outras importantes raças européias presentes nas criações de gado de corte no país são Charolês, Limousin e Simental (ABIEC, 2009; EMBRAPA, 2009).

Os zebuínos, em especial o Nelore, apresentam resistência ao calor e a parasitas. Algumas características como a pele com melanina e os pêlos curtos e finos, contribuem para torná-los altamente eficientes na produção de carne em condições tropicais e/ou subtropicais. Do cruzamento entre bovinos de raças taurinas e zebuínas resultam animais com características bastante desejáveis como precocidade sexual, acabamento de carcaça e rusticidade. Os rebanhos comerciais com esses animais cruzados apresentam melhor conversão alimentar e excelente ganho de peso. Por outro lado, a procura pelas raças zebuínas produzidas no Brasil tem crescido nos últimos anos porque as matrizes nelores são excelentes doadoras de ovócitos e muito utilizadas na produção *in vitro* de embriões (ABIEC, 2009; RODRIGUES & RODRIGUES, 2009). Esta biotécnica de reprodução vem ganhando espaço no País e em 2007 foram produzidos 211 mil embriões, colocando o Brasil entre os líderes mundiais no emprego de transferência de embriões. Apesar disso, a principal biotécnica de reprodução utilizada nacionalmente continua sendo a inseminação artificial. Sabe-se que são comercializadas anualmente 7,5 milhões de doses de sêmen bovino, das quais 50% correspondem à raça Holandesa. Estima-se que sejam inseminadas aproximadamente 15% das vacas leiteiras e 6% das fêmeas de corte brasileiras (RODRIGUES & RODRIGUES, 2009).

Segundo o último Censo Agropecuário, o RS possuía 11 milhões de cabeças de bovinos em 327.947 estabelecimentos rurais, dos quais 204.575 também possuíam gado de leite e produziram 2,7 bilhões de litros de leite naquele ano (IBGE, 2006).

Vale destacar que a Messorregião Sudoeste Rio-grandense é densamente povoada por bovinos e possuía mais de 2,5 milhões de animais, sendo a quarta zona de maior densidade de bovinos do País (84,4 animais/km²). Nela, as criações são predominantemente de gado de corte taurinos (*Bos taurus taurus*). Especificamente nas Microrregiões Homogêneas da Campanha Meridional e Campanha Central estão importantes produtores de touros, vacas e também de bezerros para engorda que são comercializados e transferidos para outras regiões do Estado (IBGE, 2006; 2009b).

Quanto ao gado de leite, segundo as estimativas da EMBRAPA, em 2006 o País possuía 20 milhões de vacas ordenhadas, incluindo animais de rebanhos leiteiros, de duplo propósito e de corte. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor, seguido dos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná. Existem importantes diferenças regionais, entre os tipos de criação e os estabelecimentos que podem ser familiares ou industriais. A principal raça utilizada em criações voltadas para produção de leite é a Holandesa. A análise da distribuição espacial da pecuária leiteira permitiu identificar diferentes zonas dentro do país quando foram consideradas a densidade animal, a produção total e a produtividade (ZOCCAL et al., 2006).

Particularmente no RS, foi possível identificar quatro pólos de produção leiteira, nas diferentes mesorregiões expostas na Figura 2. A Mesorregião do Noroeste Rio-grandense apresentou a maior densidade de vacas ordenhas (20,5 vacas/km²). Por sua vez, as Mesorregiões Centro Oriental e Nordeste Rio-grandense apresentaram densidade de 14,7 vacas ordenhadas por km² e as duas, juntas possuíam 113.447 vacas ordenhadas e correspondem à décima zona de maior produção leiteira do País. Essas três mesorregiões apresentaram produtividade superior a 2400 litros de leite por vaca por ano e estão entre as zonas de maior produtividade leiteira do país. Um quarto pólo produtor de leite do Estado pode ser observado na Mesorregião do Sudoeste Rio-grandense, especificamente na Microrregião da Campanha Meridional, essa zona apresenta baixa densidade de vacas ordenhadas (1,1 animal/km²) e alta produtividade (2.386 litros de leite/vaca/ano). Mas, diferente das anteriores, essa região apresenta alta densidade de bovinos (>80 animais/km²) e as criações são predominantemente de gado de corte (ZOCCAL et al., 2006).

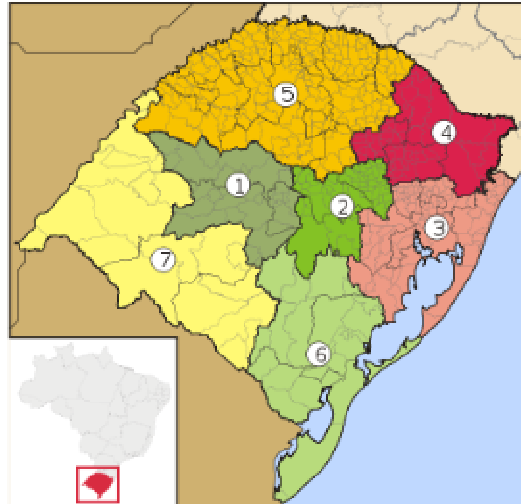


Figura 2. Mapa do Estado de Rio Grande do Sul com suas respectivas mesorregiões conforme a seguinte numeração: (1) Mesorregião Centro Ocidental Rio-grandense, (2) Centro Oriental Rio-grandense, (3) Metropolitana de Porto Alegre, (4) Nordeste Rio-grandense, (5) Noroeste Rio-grandense, (6) Sudeste Rio-grandense e (7) Sudoeste Rio-grandense (WIKIPÉDIA, 2009).



Figura 3. Mapa do Estado do Rio Grande do Sul, localização do município de Arroio do Meio, latitude $29^{\circ}4'$ Sul e longitude $51^{\circ}94'$ Oeste (IBGE, 2009a).

2.2 População alvo

O presente estudo foi realizado na Cooperativa de Suinocultores de Encantado (COSUEL) e na sua indústria de leite, denominada Dália localizada no município de Arroio do Meio, no RS conforme mostra a Figura 3. A **população alvo** do estudo foram 1.656 rebanhos de gado de leite pertencentes aos associados da cooperativa, produtores de leite em atividade nos meses de Março e Abril de 2009. A unidade de análise do estudo foram, exclusivamente, os rebanhos, mas número total de animais dos mesmos correspondia a 31.504 bovinos, dos quais 16.323 eram vacas em lactação no período. Assim, o total de animais dos rebanhos analisados correspondeu 14,7% dos bovinos da microrregião geográfica que possuía 213.980 reses. Outras cooperativas e laticínios também captam produção de leite na região (IBGE, 2009b).

A área de atuação da COSUEL-Laticínio Dália abrange 38 municípios e a maior parte deles pertence à Microrregião Geográfica de Lajeado-Estrela que, por sua vez, pertence à Mesorregião Centro Oriental Rio-grandense. A área também é conhecida como Vale do Taquari, devido ao rio mais importante da região. Cabe ressaltar que o bioma é Mata Atlântica e o clima é subtropical úmido. A composição étnica da população dos municípios da região é teuto-italo-riograndense e culturalmente também existe forte influência da colonização alemã e italiana. Os estabelecimentos são predominantemente pequenos, utilizam mão-de-obra familiar, plantam principalmente soja, milho e fumo e criam aves, suínos e gado leiteiro (IBGE, 2009b).

A cooperativa realiza um trabalho de fomento que visa a melhorar a produção dos associados e aumentar a captação de leite de qualidade. Os criadores recebem apoio de técnicos agrícolas funcionários da cooperativa e também são atendidos por veterinários autônomos recomendados pela mesma. As diretrizes da associação estimulam os criadores a melhorar a genética, a nutrição e a higiene na produção do leite. Por exemplo, os associados recebem prêmios por qualidade de leite entregue na indústria e são estimulados a utilizarem tanque de expansão para armazenamento da produção. Também existe uma preocupação especial com controle de mastite e vem sendo implantadas melhorias nas condições de higiene e no manejo da ordenha. Os criadores são incentivados a reduzir os animais improdutivos nas propriedades e a utilizar a inseminação artificial. A reposição anual nas criações é de 20 a 25% e os associados são fortemente aconselhados a comprar fêmeas para reposição. A principal origem destas matrizes é a Messorregião do Noroeste Rio-grandense, especificamente a

Microrregião de Passo Fundo. Outra importante origem das novilhas é a importação do Uruguai, país vizinho do Estado. Os critérios de escolha dos animais envolvem principalmente as características de produção. Quanto à sanidade dos rebanhos, é realizado controle de tuberculose e de brucelose e os animais são vacinados para febre aftosa e clostridioides. Os animais importados são premunidos para prevenção da tristeza parasitária. Quando ocorrem problemas reprodutivos, poucos deles são investigados. A estratégia escolhida pelos técnicos é utilizar vacina polivalente contra doenças respiratórias e reprodutivas em todo rebanho, com reforço vacinal a cada oito meses, na propriedade com problema. O laticínio exerce um forte controle quanto à presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Atualmente as metas dentro da cooperativa são especialização e aumento da produção. Os associados com criações mais produtivas são estimulados a aumentar a produção e os menos produtivos são aconselhados a melhorar ou trocar de atividade (KAPLAN, L.H. comunicação pessoal).

2.3 Vírus da diarreia viral bovina

O vírus da diarreia viral bovina (“bovine viral diarrhea virus”, BVDV) pertence ao gênero *Pestivirus*. É um vírus RNA de fita simples e orientação positiva, apresenta nucleocapsídeo com simetria icosaédrica e possui envelope. O vírion tem formato arredondado com cerca de 40 a 60 nm de diâmetro e é facilmente inativado por calor, solventes orgânicos e detergentes. O vírus apresenta grande diversidade genômica e antigênica, e apresenta estreita relação com outros membros do gênero *Pestivirus*. As principais características dos vírus desse gênero são a sua diversidade e a capacidade de estabelecer dois tipos de infecção, a transitória que induz imunidade e a persistente que é acompanhada da imunotolerância específica (THIEL et al., 1996; VILCEK & NETTLETON, 2006; PETERHANS & SCHWEIZER, 2009).

O gênero *Pestivirus*, juntamente com os gêneros *Flavivirus* e *Hepacivirus*, pertencem à família *Flaviviridae*. O nome *pesti* vem do latim *pestis suum* e refere-se ao vírus da peste suína clássica (“classical swine fever virus”, CSFV) responsável por uma doença altamente infecciosa de suínos com grande impacto sócio-econômico e de notificação obrigatória pelas normas da “World Organisation for Animal Health” (OIE) (HORZINEK, 1991; THIEL et al., 1996). Inicialmente, a classificação dos pestivírus era baseada no hospedeiro de origem, mas tornou-se inapropriada porque esses vírus não são espécie-específicos. A caracterização antigênica por anticorpos monoclonais e a

análise molecular do genoma comprovaram que o BVDV e o vírus da doença da fronteira (“border disease virus”, BDV) infectam principalmente bovinos e ovinos, mas também podem infectar suínos, javalis e outros ruminantes domésticos e selvagens da Ordem *Artiodactyla*. O CSFV é um pouco mais restrito porque infecta naturalmente suínos e javalis. Já os ruminantes selvagens podem ser infectados por pestivírus de animais domésticos ou por outros pestivírus que parecem ser melhores adaptados a esses hospedeiros (EVERMANN, 2005; VILCEK & NETTLETON, 2006).

O termo BVDV abrange duas espécies virais distintas, BVDV-1 e BVDV-2, anteriormente classificadas como genótipos (RIDPATH et al., 1994). Novas análises filogenéticas do genoma viral suportam que os pestivírus bovinos anteriormente classificados como “atípicos” (SCHIRMEIER et al., 2004; STALDER et al., 2005) sejam re-classificados como uma nova espécie denominada BVDV-3 (LIU et al., 2009).

2.4 Organização genômica dos pestivírus

Quatro espécies virais (BVDV-1, BVDV-2, BDV, CSFV) e uma proposta de espécie de pestivírus de girafa formam o gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* (BECHER et al., 2003). O genoma viral é constituído de uma fita simples de RNA com orientação positiva, com 12.500 nucleotídeos. Apresenta duas regiões não traduzidas (“untranslated regions”, UTRs) nas extremidades 5’ e 3’ e uma fase de leitura aberta (“open reading frame”, ORF). Essa ORF codifica uma poliproteína de aproximadamente 3.900 aminoácidos, processada por proteases virais e celulares em 11 ou 12 proteínas maduras durante e após a tradução. Tais genes das proteínas seguem a esta ordem: autoprotease N terminal (N^{PRO}), proteína do capsídio (C), glicoproteínas do envelope (E^{RNS} , E1 e E2) e proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (THIEL et al., 1996; LINDENBACH et al., 2007), como mostra a Figura 4.

Dentre as regiões do RNA viral, a 5’UTR é mais conservada e tem sido historicamente usada para genotipagem dos pestivírus (RIDPATH et al., 1994; VILCEK et al., 2001). A região codificante de outros dois genes também são usados na filogenia de pestivírus, gene N^{PRO} é exclusivo dos pestivirus e o gene E2 codifica a glicoproteína imunodominante do envelope viral. A utilização das três regiões genômicas apresentou melhores resultados na análise filogenética e permitiu a classificação das diferentes espécies, tipos e subtipos de pestivírus (BECHER et al., 2003; VILCEK et al., 2005; LIU et al., 2010). Cabe ressaltar que os critérios de demarcação das espécies virais nos

gêneros incluem a sequência de nucleotídeos, as características antigênicas com suas respectivas relações sorológicas e o hospedeiro original (VAN REGENMORTEL & MAHY, 2004; VILCEK & NETTLETON, 2006). Assim, estudos sorológicos tentam correlacionar características genéticas e sorotípicas dos pestivírus (YESILBAG et al., 2008; MINAMI et al., 2009; STAHL et al., 2009; LIU et al., 2010).

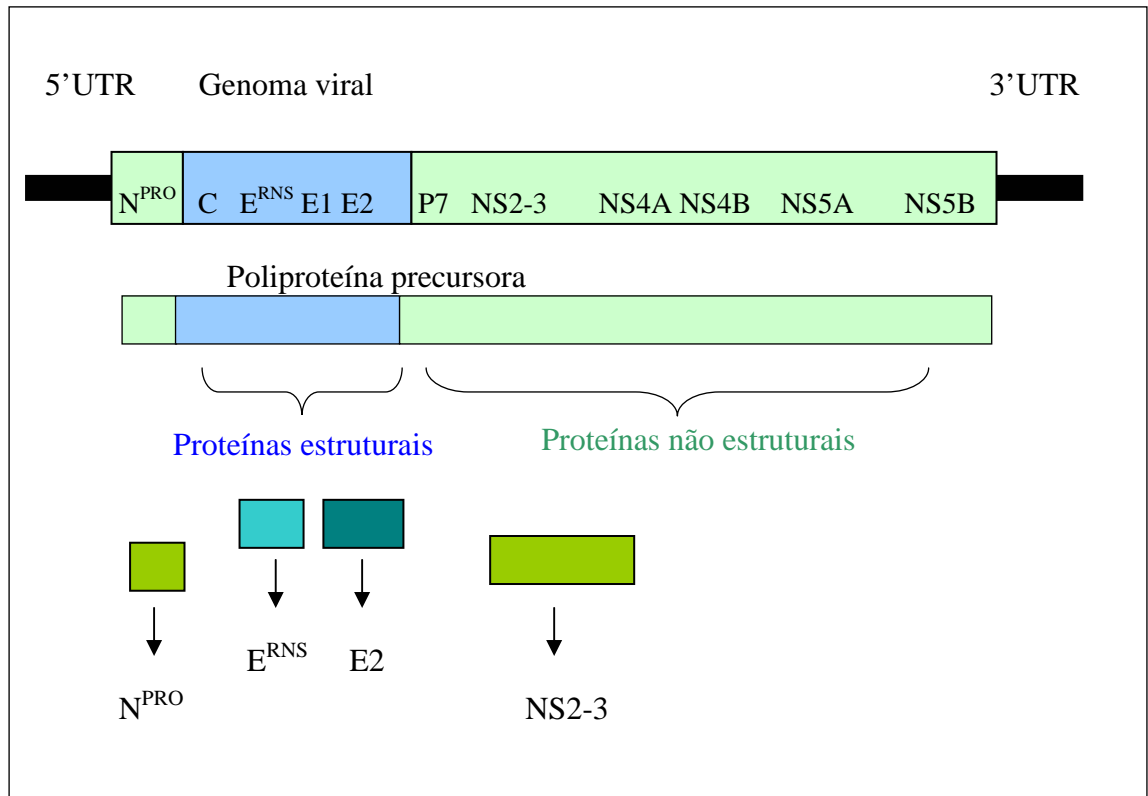


Figura 4. Representação esquemática da organização genômica, da poliproteína precursora e das proteínas utilizadas no diagnóstico do BVDV. UTR é região não traduzida (“untranslated region”), NS é não estrutural (“non structural”), N^{PRO} é nucleoprotease, C é capsídeo e E^{RNS} é ribonuclease solúvel. Figura elaborada pela autora adaptada da bibliografia consultada.

Quanto às proteínas, N^{PRO} e E^{RNS} são únicas dos pestivírus e não possuem equivalentes nos outros gêneros da Família *Flaviviridae* (THIEL et al., 1996). A N^{PRO} apresenta antagonismo ao interferon, comprometendo a resposta imune adaptativa e também a resposta imune inata do hospedeiro (RUGGLI et al., 2005; GIL et al., 2006; SCHWEIZER et al., 2006). A glicoproteína E^{RNS} compõe a partícula viral, mas também é secretada por células infectadas para o meio extracelular. Com relação às suas funções

biológicas, a E^{RNS} é uma enzima ribonuclease solúvel e está envolvida na inibição da expressão de interferon (MÄTZENER et al., 2008). Experimentos *in vivo* sugerem que ambas as proteínas desempenham importantes papéis na persistência viral por vias diferentes (PETERHANS & SCHWEIZER, 2009).

A glicoproteína E^{RNS} é importante no diagnóstico do BVDV, porque é bem conservada entre os vírus e pode ser detectada nos tecidos ou no soro dos animais infectados, também induz a produção de anticorpos parcialmente neutralizantes (HAINES et al., 1992; SALIKI & DUBOVI, 2004; KAMPA et al., 2007). A outra importante glicoproteína dos pestivírus é denominada E2 e possui uma porção transmembrana, estando exposta na superfície da partícula viral, formando complexos heterodímeros com E1 (E1-E2) e homodímeros (E2-E2). Também é a proteína viral imunodominante e induz a formação dos anticorpos neutralizantes no hospedeiro. Ademais, é a proteína mais variável dos pestivírus, sendo usada para classificação dos sorotipos virais e para o diagnóstico (THIEL et al., 1996; CHASE et al., 2004).

As proteínas não-estruturais dos pestivírus ocupam os dois terços finais da poliproteína e estão relacionadas com a replicação viral. Todos os pestivírus apresentam NS2-3 e somente nos isolados citopáticos ocorre à clivagem parcial da proteína precursora gerando NS3. A proteína NS3 está relacionada ao efeito lítico do vírus em cultivos celulares (THIEL et al., 1996; TAUTZ et al., 1998). Em ambas as formas da proteína, o domínio NS3 (anteriormente denominado p80) é altamente conservado entre todos os pestivírus e é capaz de induzir a produção de anticorpos no hospedeiro, sendo amplamente utilizado para diagnóstico (THIEL et al., 1996; CHASE et al., 2004; SANDVIK, 2005).

2.5 Diversidade do BVDV

Como outros vírus que possuem RNA genômico, o BVDV apresenta grande diversidade genética. Os principais mecanismos envolvidos nessa importante característica são as mutações pontuais produzidas por erros da RNA polimerase dependente de RNA e as recombinações genéticas. Essas podem ocorrer por duplicações e inserções de material genético entre diferentes vírions ou de RNA celular. As consequências genéticas das mutações são extremamente variáveis e o surgimento de um novo vírus depende, principalmente, das interações entre o vírus e o hospedeiro. Algumas mutações podem resultar em modificações do antígeno viral e auxiliar no

escape da resposta imune do hospedeiro. Outras mutações, porém ocorrem sem representar vantagens e nem desvantagens. Deste modo, durante a infecção do BVDV, cada multiplicação viral potencialmente pode gerar novas variantes e o acúmulo de alterações genômicas pode gerar novos tipos virais. Os diferentes tipos de infecção, com ou sem pressão do sistema imune do hospedeiro, também colaboram para a diversidade genética do vírus (THIEL et al., 1996; HAMERS et al., 2001; BOLIN & GROOMS, 2004; BACHOFEN et al., 2008; PETERHANS & SCHWEIZER, 2009).

A diversidade genética observada entre os isolados de BVDV em todo mundo resulta em uma correspondente diversidade antigênica também identificada. Assim, os BVDV são diversos entre si, mas ainda mantem similaridades antigênicas entre eles e com outros pestivírus, e a força desta relação é variável (HAMERS, 2001; BOLIN & GROOMS, 2004; PETERHANS & SCHWEIZER, 2009).

2.6 Biotipos virais

Com relação ao efeito lítico em cultivos celulares, as amostras do BVDV são classificadas em dois biotipos, **não citopáticos** e **citopáticos**. Ambos são encontrados em infecções naturais, mas BVDV não citopáticos são mais prevalentes e considerados como vírus reservatórios. Por outro lado, vírus citopáticos são raros e encontrados em bovinos com Doenças das Mucosas, uma forma clínica rara e fatal de infecção pelo BVDV. O vírus citopático é gerado por mutações ou rearranjos genéticos com duplicações e/ou inserções de genoma viral ou celular no vírus original. As alterações ocorrem na região do gene NS2-3 e ativam a clivagem da proteína. Ambos os biotipos possuem a proteína NS2-3, mas somente nos vírus citopáticos esta proteína precursora é parcialmente clivada e gera a proteína NS3 (THIEL et al., 1996; TAUTZ et al., 1998; BOLIN & GROOMS, 2004).

A característica biológica mais importante dos BVDV não citopáticos é sua capacidade de causar infecção persistente, própria dos pestivírus (PETERHANS et al., 2003; BOLIN & GROOMS, 2004).

Outra importante repercussão dos vírus não citopáticos é a dificuldade de identificá-los *in vitro*. Como a presença de vírus não causa alteração aparente nos cultivos celulares, é necessário realizar um teste específico para sua identificação, o que torna o isolamento viral laborioso e as contaminações, muito frequentes. O BVDV é um importante contaminante de cultivos celulares por dois motivos, é difícil de ser

identificado e está presente no soro de fetos bovinos naturalmente infectados. O soro desses animais é usado como suplemento de meios de cultivo celular e destinado tanto para diagnóstico como para produção de vacinas. Assim, quantidades mínimas de vírus podem replicar em células de mamíferos e comprometer os resultados ou produtos finais dos cultivos celulares (FALCONE et al., 1999; SALIKI & DUBOVI, 2004; SCHIRRMIEIER et al., 2004).

2.7 Tipos de infecções causadas pelo BVDV

O BVDV é capaz de estabelecer dois tipos de infecção: a transitória e a persistente. A **infecção transitória** ocorre quando animais imunocompetentes são expostos a vírus citopáticos ou não citopáticos. Nesse caso o curso é de 5 a 10 dias e os sinais clínicos são diversos, dependendo principalmente da imunidade e idade do hospedeiro, da amostra viral envolvida e dos outros patógenos associados. O vírus possui afinidade por tecido linfocitário e causa linfopenia, leucopenia e imunodepressão. Na infecção transitória existe a indução de uma resposta imune que normalmente é capaz de debelar a infecção. Os animais convalescentes apresentam imunidade prolongada e protetora contra novas infecções do mesmo tipo viral. Quanto aos anticorpos contra BVDV, os bovinos soroconvertem e, inicialmente, apresentam altos títulos de anticorpos que vão diminuindo com o tempo, embora perdurem por toda a vida do animal (HOUE, 1999; PETERHANS et al., 2003).

A **infecção persistente** ocorre, quando vacas prenhes não imunes se infectam com o BVDV no início da gestação e, durante a viremia materna, o vírus é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto. Esse tipo de infecção ocorre especificamente por infecção de vírus não citopáticos e em fetos com 40 a 120 dias de gestação. Nesse período, o concepto ainda não apresenta seu sistema imune suficientemente desenvolvido e o vírus estabelece nele a infecção persistente. Esse bovino, prematuramente exposto ao BVDV *in utero*, passa a reconhecer o patógeno como próprio (“self”) e desenvolve uma imunotolerância específica ao vírus. O bezerro persistentemente infectado (PI) pode nascer fraco ou normal, mas excreta vírus por toda a sua vida em suas secreções e excreções (MCCLURKIN et al., 1984; BROCK et al., 1998; ARENHART et al., 2009). Geralmente elimina grandes quantidades de vírus que são facilmente detectados (SALIKI & DUBOVI, 2004), mas a presença de anticorpos neutralizantes, induzidos por infecção de outros tipos virais, pode causar redução na

quantidade de vírus (BROCK et al., 1998). Outra situação em que esses animais apresentam anticorpos é após a ingestão do colostro. A vaca, infectada durante a gestação, apresenta altos títulos de anticorpos e o seu bezerro PI pode apresentar anticorpos circulantes e viremia baixa por mais de 40 dias após seu nascimento (BROCK et al., 1998; LINDBERG & ALENIUS, 1999; HOUE et al., 2006).

Somente poucos animais PI são assintomáticos e alcançam à idade adulta, nesse caso a progênie de uma vaca PI será PI também (LINDBERG & ALENIUS, 1999; LAUREYNS et al., 2009).

Embora a infecção persistente seja menos frequente do que a infecção transitória, ela é crucial para a persistência do BVDV na população de bovinos. A combinação dos dois tipos de infecção, transitória e persistente, caracteriza a adaptação do agente viral com sua população de hospedeiros (PETERHANS & SCHWEIZER, 2009).

2.8 Formas da doença

A diarreia viral bovina foi descrita pela primeira vez por Olafson et al. (1946), como uma doença infecciosa e aguda de bovinos. Os animais afetados apresentavam febre alta, anorexia, gastrenterite severa, ulcerações nas mucosas oral e nasal, salivação intensa e descarga nasal. Apesar da mortalidade baixa e do fato de que alguns animais não tivessem demonstrado sinais clínicos (forma subclínica), as vacas prenhes, especialmente novilhas, abortavam entre 10 dias e três meses após o início da doença. A transmissão experimental confirmou os achados iniciais e os bovinos inoculados apresentaram tanto leucopenia acentuada, como hemorragias e erosões ao longo do aparelho digestivo (OLAFSON et al., 1946). Essa apresentação aguda clássica representa somente uma das formas da infecção e, atualmente, sabe-se que a doença varia muito, desde quadros superagudos até subclínicos.

O vírus infecta seu hospedeiro por via oronasal, replica inicialmente nas tonsilas e após, causa viremia que dissemina o agente para outros órgãos internos do animal. Todos os BVDV não citopáticos são capazes de infectar o feto. Esta infecção, dependendo da fase gestacional, pode causar reabsorção embrionária, malformações congênitas como hipoplasia cerebelar, microftalmia, braquitismo, artrogripose e abortos em qualquer idade ou ainda levar a geração de bovinos PI. O patógeno apresenta grande tropismo por tecidos epiteliais e linfóides, também induzir algum grau de

imunossupressão nas infecções transitórias. A maioria dos isolados de ambas as espécies virais (BVDV-1 e BVDV-2) apresenta baixa virulência e causa a uma doença branda e subclínica. Nestes casos, os animais desenvolvem febre moderada, leucopenia e títulos de anticorpos neutralizantes que podem ser encontrados em bovinos não vacinados. Estima-se que 70 a 90% das infecções causadas por BVDV ocorram sem manifestação de sinais clínicos (BROCK, 2004; BOLIN & GROOMS, 2004).

O vírus está presente essencialmente em todas as secreções e excreções. Os sinais, quando encontrados, são variáveis e dependem da imunidade do hospedeiro, da época da infecção, da amostra viral envolvida e dos outros patógenos associados. Animais PIs representam a principal fonte de infecção para os outros bovinos do rebanho (MCCLURKIN et al., 1984; BROCK et al., 1998; LINDBERG & ALENIUS, 1999; NISKANEN & LINDBERG, 2003).

Uma forma muito comum de apresentação é a reprodutiva, onde ocorre diminuição do desempenho dos rebanhos afetados, essa pode ser subclínica ou acompanhada de febre, inapetência, retorno tardio ao cio, aborto e malformações congênitas (BAKER, 1995; NISKANEN et al., 1995; HOUE, 1999; ROBERT et al., 2003; GROOMS, 2006).

A forma respiratória é outro grande problema causado por sua ação direta e indireta na fase de recria dos bovinos. Novamente a infecção transitória e a consequente imunossupressão, estão envolvidas na patogenia do Complexo Respiratório Bovino, uma doença, frequentemente, aguda e severa. O BVDV compõe o grupo de agentes virais e bacterianos responsáveis por essa enfermidade que leva a perda de peso, retardo no crescimento e que pode evoluir para pneumonia e morte dos bezerros (DIÉGUEZ et al., 2009; FULTON et al., 2009a; VAN CAMPEN, 2009).

O comprometimento da saúde dos rebanhos leiteiros causada pela virose também tem efeito indireto sobre a glândula mamária das vacas em lactação, assim, a infecção também está associada ao aumento da frequência de mastite (BEAUDEAU et al., 2005; BERENDS et al., 2008).

Na forma hemorrágica aguda ou superaguda ocorre trombocitopenia e hemorragias (CORAPI et al., 1989). Nesse caso a doença se manifesta tanto em bezerros como adultos e é causada por isolados mais virulentos posteriormente identificados como uma nova espécie BVDV, denominada BVDV-2 (RIDPATH et al., 1994).

A Doença das Mucosas é uma forma rara e fatal de apresentação da virose que acontece em bovinos com até 24 meses de idade. E, diferente da forma hemorrágica trombocipênica super-aguda, só acomete alguns animais do rebanho, os bovinos PI. Sua patogenia está relacionada à super-infecção do hospedeiro por dois biotipos do BVDV. Durante a vida do bovino PI o vírus não citopático sofre mutações e, quando gera uma variante viral citopática, desencadeia a doença. Por esse motivo, a Doença das Mucosas é uma sequela tardia da infecção persistente estabelecida pelo BVDV (BAKER, 1995; TAUTZ et al., 1998).

Entretanto, não é possível explicar todas as formas de apresentação da enfermidade unicamente pela diversidade genética dos tipos virais envolvidos. A doença causada pela infecção do BVDV é resultado da interação do vírus com seu hospedeiro. A principal característica do BVDV continua sendo a diversidade. Novos tipos e subtipos virais continuam sendo descritos e novas formas de apresentação de infecção são identificadas, como a dermatite generalizada (ODEON et al., 2003; FERREIRA et al., 2008). Por outro lado, as caracterizações moleculares tem permitido identificar que nem todas as doenças agudas severas estão relacionadas com o BVDV-2, por exemplo, também podem ser resultado da infecção pelo BVDV-1b (LUNARDI et al., 2008).

2.9 Diagnóstico

Em função da diversidade do agente viral e das suas diferentes formas de apresentação o diagnóstico da infecção pelo BVDV depende de confirmação laboratorial que pode ser obtida através da detecção de anticorpos, antígenos ou genoma viral (SANDVIK, 2005). Os motivos para realizar uma análise laboratorial para BVDV podem ser: investigação de infecção aguda ou caso clínico, investigação de falhas reprodutivas, detecção e eliminação de animais PIs de um rebanho, teste da eficiência de vacinação, controle de qualidade de produtos biológicos ou genotipagem do vírus (SALIKI & DUBOVI, 2004). O diagnóstico adequado ainda depende de uma estratégia de abordagem que associe as diferentes técnicas laboratoriais disponíveis para alcançar o objetivo desejado. Outros fatores que também contribuem decisivamente para o diagnóstico são: identificação, amostragem, coleta, transporte, conservação e história do material biológico necessário para o teste desejado (SANDVIK, 2005; HOUE et al., 2006; SALIKI & DUBOVI, 2004; LAURYENS et al., 2009).

Dentre os testes utilizados no diagnóstico de BVDV, o **isolamento viral** é a prova confirmatória por excelência, porém necessita de amostras coletadas assepticamente e conservadas sob refrigeração. Ademais é um teste laborioso, demorado e precisa de cultivos celulares suscetíveis, e por esses motivos não é indicado para análise de uma grande quantidade de amostras (SANDVIK, 2005; HOUE et al., 2006).

A prova de **imunoistoquímica** é indicada principalmente para identificação de bezerros PI jovens. É realizada a partir de biópsia de pele da orelha e permite identificar o vírus associado com tecidos e tipos celulares específicos (HAINES et al., 1992). É o teste de eleição porque detecta o antígeno viral e não é prejudicado por anticorpos maternos (CORNISH et al., 2005), porém depende diretamente da conservação do epítipo viral e do tipo de anticorpo monoclonal utilizado (GRIPSHOVER et al., 2007).

A prova de **imunofluorescência** sobre corte de tecido congelado é útil pela agilidade na identificação de antígenos virais, mas tem como pontos fracos a necessidade de uma boa conservação das amostras, corre o risco de surgimento de reações inespecíficas e exige experiência para interpretação das leituras (GREISER-WILKE et al., 2007).

A **identificação de anticorpos** contra BVDV é amplamente utilizada como um importante parâmetro para avaliar a resposta imune induzida por infecção natural ou vacinação. Os testes sorológicos são excelentes para utilização em levantamentos epidemiológicos e monitoria de rebanhos (LINDBERG & ALENIUS, 1999). A sorologia individual é importante para identificar os animais suscetíveis à infecção e auxiliar na identificação dos animais PI de rebanhos com infecção ativa (HOUE et al., 2006). Os principais antígenos virais capazes de induzir resposta imune humoral estão presentes nas duas glicoproteínas (E^{RNS} e E2) e na proteína não estrutural NS2-3. A glicoproteína E^{RNS} varia pouco, mas induz uma resposta moderada de anticorpos parcialmente neutralizantes. Por outro lado, a glicoproteína E2 (anteriormente denominada gp56) é a mais imunogênica (imunodominante) e sua presença induz a formação de anticorpos neutralizantes da infecção viral. A proteína NS2-3 do BVDV é bem conservada dentro do gênero e bastante imunogênica. Sua principal utilização é para diagnóstico, que, nesse caso, pode ser denominado “panpestivírus” (BRACKENBURY et al., 2003; GREISER-WILKE et al., 2003; CHASE et al., 2004).

Entre os testes sorológicos, a **soroneutralização** é uma prova de referência por ser muito específica e facilmente adaptável ao tipo ou subtipo de BVDV desejado. Apesar disso, detecta somente anticorpos neutralizantes, é demorada, laboriosa e

envolve obrigatoriamente o cultivo celular e manipulação de vírus (SALIKI & DUBOVI, 2004; SANDVIK, 2005).

Já os testes de **ELISA para detecção de anticorpos** são amplamente utilizados por serem provas práticas, rápidas e biosseguras. Esses ainda podem ser automatizados e detectam epítomos não neutralizantes, sendo os mais apropriados para utilização em larga escala. Como desvantagens, podem apresentar reatividade cruzada com outros pestivírus e sensibilidade variável, dependendo diretamente dos epítomos antigênicos presentes no teste. Os principais antígenos utilizados nestes testes pertencem à proteína NS2-3 (SALIKI & BUBOVI, 2004; SANDVIK, 2005). Os testes de **ELISA de captura de antígeno** de BVDV permitem identificar partes de vírus em amostras de soro ou tecido de biópsia de pele de orelha. São apropriados para identificar animais PI, porém a interferência de anticorpos maternos pode diminuir sua sensibilidade. Por esta razão não são indicados para bezerros menores de três meses de idade. Os principais antígenos utilizados neste tipo de testes pertencem a glicoproteína E^{RNS} (CORNISH et al., 2005; DRISKELL & RIDPATH, 2006; KAMPA et al., 2007).

As técnicas de **biologia molecular** permitem identificar (VILCEK et al., 1994), analisar (FLORES et al., 2002), diferenciar (CANAL et al., 1996; VILCEK et al., 2001) e quantificar pestivírus (UTTENTHAL et al., 2003; HOFFMANN et al., 2006), bem como identificar variantes virais (SCHIRRMEIER et al., 2004; STHAL et al., 2009) e novos pestivírus (KIRKLAND et al., 2007). Começaram a ser utilizadas na década passada para o diagnóstico de pestivírus e inicialmente possuíam quatro etapas separadas: extração de RNA, transcrição reversa (RT) de RNA em DNA complementar, amplificação de genoma viral por reação em cadeia da polimerase (PCR) e detecção dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose (RIDPATH et al., 1994; VILCEK et al., 1994). Esse tipo de teste permitiu grandes avanços na genotipagem de amostras virais e podia ser sensível e relativamente rápido quando comparado ao cultivo celular. Entretanto apresentava como principais desvantagens, o risco de resultados falso-positivos por contaminação cruzada de amostras e o risco de falsos negativos por baixa sensibilidade da técnica usada (PATON et al., 2000; SANDVIK, 2005). Posteriormente, a RT-PCR com sonda “Taq man”, permitiu a combinação de duas ou três etapas e tornou o teste molecular mais ágil (MCGOLDRICK et al., 1999). Foram também desenvolvidos RT-PCR em tempo real para detecção de BVDV e outros pestivírus (BHUDEVI & WEINSTOCK, 2001; LETELLIER & KERKHOF, 2003; BAXI et al., 2006; HOFFMANN et al., 2006; YOUNG et al., 2006). O formato de

tempo real permitiu a combinação de várias características úteis para rotina diagnóstica, como a detecção em tubo-fechado, o que minimiza a contaminação horizontal das amostras, o formato duplex ou “multiplex” para distinguir vírus diferentes ou para usar controles de extração de RNA, e, por fim, a quantificação da carga viral em amostras (LA ROCCA & SANDVIK, 2009). Por esses motivos, atualmente essas técnicas oferecem rapidez e alta sensibilidade, especialmente para testar amostras com pequena quantidade de vírus como, por exemplo, amostras coletivas de tanque de leite ou grupo de soros individuais. Nesses casos, as provas moleculares são ferramentas úteis para o diagnóstico de rebanho ou lote de animais (HOUE et al., 2006; MUNHOZ-ZANZI et al., 2006; HOFFMANN et al., 2009). O diagnóstico de rebanho por biologia molecular ainda é menos utilizado que as provas sorológicas, mas vem ganhando espaço (DREW et al., 1999; MUNHOZ-ZANZI et al., 2000; HILL et al., 2009). Os melhores resultados são obtidos na associação de testes sorológicos e moleculares (MARS & VAN MAANEN, 2005; DRISKELL & RIDPATH, 2006) ou na elaboração de uma estratégia diagnóstica que utiliza vários testes para chegar ao objetivo final desejado (LAUREYNS et al., 2009).

Quando o objetivo do teste for o **diagnóstico de rebanho**, de grupo de animais ou de lote, é preciso usar uma amostragem adequada para essa finalidade. Inicialmente, a utilização do “**spot test**” permitiu a identificação de rebanhos infectados usando uma pequena amostragem individual de animais. Essa amostragem foi altamente representativa do grupo, desde que os bovinos selecionados estivessem sujeitos às mesmas condições de criação (HOUE, 1992). Posteriormente, amostras de **tanque de leite** demonstraram ser representativas do plantel, pois existia uma forte correlação entre os níveis de anticorpos identificados na sorologia individual das vacas que contribuíam para o tanque e na sua amostra coletiva. Assim, o estado imune do grupo de vacas pode ser aferido pela análise dessa amostra coletiva para BVDV (NISKANEN et al., 1991; NISKANEN, 1993). Usando essa abordagem, altos títulos de anticorpos contra BVDV, detectados por ELISA, puderam ser tomados como indicadores indiretos da presença de animais PI em rebanhos não vacinados. Os anticorpos também passaram a servir como indicadores indiretos da infecção ativa de BVDV no rebanho (NISKANEN, 1993). O terceiro tipo de amostragem coletiva descrito para diagnóstico de rebanho do BVDV foi o “pool” ou conjunto de amostras individuais de um grupo que são reunidas e posteriormente, o “pool” ou o conjunto é analisado. Este tipo de amostragem tem sido muito usado em rebanhos gado de corte (MUNHOZ-ZANZI et al., 2000; PILZ et al.,

2007; SMITH et al., 2008). A utilização de amostragem de rebanho, por “spot test”, tanque de leite ou “pool” de soros, associada às técnicas sensíveis tem permitido a monitoria de rebanhos ou de categorias animais dentro de rebanhos, contribuindo para a identificação de rebanhos ou lotes de animais com infecção ativa pelo BVDV (HOUE, 1992; NISKANEN et al., 1993; MUNHOZ-ZANZI et al., 2000; LAUREYNS et al., 2009).

O principal teste utilizado para o diagnóstico de rebanho ainda é a dosagem de anticorpos por ELISA e a associação do ELISA com amostragem de tanque de leite é uma importante ferramenta para monitoria de rebanhos leiteiros (PATON et al., 1998; LINDBERG & ALENIUS, 1999; THOBOKWE et al., 2004; MARS & VAN MAANEN, 2005; BEAUDEAU et al., 2005; DIEGUEZ et al., 2008). A principal vantagem da amostragem de tanques de leite é a facilidade de obtenção de material biológico do grupo mais representativo dos rebanhos leiteiros: vacas em lactação. Esse tipo de amostragem reduz em muito as dificuldades logísticas intrínsecas às amostragens individuais, sendo bem mais simples e prático. Sua principal limitação é quando as vacas em lactação não mantem contato com as outras categorias do rebanho e podem apresentar um perfil distinto como, por exemplo, em rebanhos muito grandes ou criações com mais de uma sede. Nesses casos, as outras categorias animais devem ser amostradas por outro método como, por exemplo, “spot test” (PRITCHARD, 1998; BEAUDEAU et al., 2001; LINDBERG & HOUE, 2005).

Uma vez que um rebanho ou grupo de animais é identificado como positivo, surge um novo desafio ainda maior: a identificação de todos os animais PI de um rebanho. Apesar de já existirem técnicas apropriadas, a identificação de todos os animais PI ainda é difícil porque esses animais são raros, não são detectados em provas sorológicas e podem ser assintomáticos. Além disso, o BVDV apresenta grande diversidade e a identificação do vírus ou partes dele pode ser prejudicada pela presença de anticorpos maternos em animais jovens. De maneira geral, para identificar todos os bovinos PI de um rebanho, toda a população deve ser testada e isto necessita de planejamento para ser executado (SANDVIK, 2005; HOUE et al., 2006; LAUREYNS et al., 2009).

2.10 Epidemiologia

A diarreia viral bovina é uma enfermidade predominantemente subclínica, resultado da grande adaptação do vírus ao seu hospedeiro. Os diversos tipos de BVDV produzem uma ampla variedade de quadros clínicos que precisam ser confirmados laboratorialmente. Todos possuem estreita relação genética e antigênica e também são capazes de atravessar a placenta e infectar o feto, sendo responsáveis por diminuição do desempenho reprodutivo dos rebanhos afetados (HOUE, 1999; BOLIN & GROOMS, 2004; MOENNIG et al., 2005; PETERHANS & SCHWEIZER, 2009).

A transmissão do BVDV ocorre, principalmente por contato direto entre animais, mas o vírus também pode ser transmitido indiretamente por insetos hematófagos, fômites, embriões, soro fetal bovino ou sêmen (TARRY et al., 1991; NISKANEN & LINDBERG, 2003; WRATHALL et al., 2006; STHAL et al., 2007, RIKULA et al., 2008). O animal PI é sempre a principal fonte de infecção para os outros animais suscetíveis (HOUE, 1999; LINDBERG & ALENIUS, 1999). Eles apresentam vírus no sangue, soro, leite, urina, fluidos fetais, sêmen, secreções orais, nasais, genitais e oculares (BROCK et al., 1998; LINDBERG & ALENIUS, 1999; SALIKI & DUBOVI, 2004; ARENARTH et al., 2009). A transmissão para animais imunocompetentes causa viremia breve e uma imunossupressão transitória que pode predispor o hospedeiro a infecções por outros patógenos. Quanto à soroconversão, BVDV induz uma resposta humoral prolongada e protetora. Por esse motivo a infecção transitória causada pelo BVDV pode ser auto-limitante em rebanhos, desde que esses não possuam fêmeas não imunes, prenhes. Por outro lado, se existirem vírus e fêmeas prenhes suscetíveis, a infecção persistente pode se estabelecer. A geração de bezerros PIs garante a permanência da virose no rebanho. A presença desses bovinos PI é o ponto central na epidemiologia da virose. Diferente da situação em animais imunocompetentes, a infecção persistente não é auto-limitante, porque estes bovinos afetados excretam continuamente o vírus e são reservatórios do patógeno no rebanho (HOUE, 1999; LINDBERG & HOUE, 2005).

Novos bezerros PIs podem ser gerados a qualquer momento em rebanhos de cria que possuam fêmeas prenhes não imunes (“naïves”) expostas ao BVDV não citopático no terço inicial de sua gestação. Outra situação, menos frequente, envolve a fêmea adulta PI assintomática, e nesse caso sua progênie sempre será PI também (LINDBERG & ALENIUS, 1999; LINDBERG & HOUE, 2005).

A persistência viral é crucial na epidemiologia da infecção pelo BVDV e este tipo de evasão viral é responsável pela permanência do agente no rebanho. Apesar de

estarem presentes em baixa prevalência, inferior a 2% da população, bovinos PIs excretam grandes quantidades de vírus e induzem a soroconversão na maioria dos outros animais do rebanho (LINDBERG & HOUE, 2005; PETERHANS & SCHWEIZER, 2009). O conhecimento dessas importantes características da virose permitiu definir um método de amostragem para identificação dos rebanhos infectados, o “spot test” (HOUE, 1992). O princípio do teste preconiza a amostragem de soros individuais de bovinos da categoria mais jovem do rebanho, animais de recria de 6 a 18 meses de idade, onde é possível observar a soroconversão por exposição viral sem a interferência dos anticorpos maternos adquiridos pela ingestão do colostro. Esses bovinos servem como sentinelas e refletem o status sorológico mais recente do rebanho desde que não sejam vacinados ou recentemente introduzidos na criação. A análise de cinco ou dez animais é o padrão-ouro de amostragem coletiva para identificação da virose no rebanho. Através do resultado dessa avaliação, o status imune deste pequeno grupo é representativo o suficiente para indicar, com alto grau de confiança, o nível de exposição do grupo ao agente viral. A única exceção ocorre pela eliminação recente do bovino PI. Nesse caso os seus contemporâneos de categoria ainda refletirão o status imune de uma infecção recente (HOUE, 1999).

Como a soroconversão induzida pelo BVDV permanece por toda vida do animal, a idade da categoria soropositiva indica o período de tempo em que ocorreu a exposição ao vírus. Assim, em rebanhos em processo de limpeza da infecção ou descontaminação, os animais mais velhos são soropositivos e os mais jovens soronegativos. Nessa situação, o status sorológico da categoria apresenta uma mudança gradual à medida que os animais são substituídos. Por isso, as vacas de primeira lactação formam a primeira categoria de bovinos adultos a apresentar um novo status imune e também pode ser amostrada por “spot test” para monitoria de rebanhos de gado de leite durante o processo de limpeza da infecção (LINDBERG & ALENIUS, 1999; MARS & VAN MAANEN, 2005).

O fator de risco mais importante para entrada da infecção pelo BVDV em rebanhos é a compra de animais. Em rebanhos de cria a introdução de vacas ou novilhas prenhas representa grande risco porque essas podem ser PIs ou estarem gestando bezerros PIs. O ideal é que fêmeas compradas tenham origem e histórico conhecidos, sejam testadas ou fiquem isoladas do resto do rebanho, pelo menos até a primeira parição. Caso esses cuidados não sejam tomados, as fêmeas recentemente adquiridas e ou seus bezerros poderão iniciar a contaminação do rebanho de cria pela categoria

animal mais nobre, as vacas recém-paridas (LINDBERG & ALENIUS, 1999; MAINAR-JAIME et al., 2001).

2.11 BVDV no Brasil

As enfermidades associadas ao BVDV são muito comuns em todo o mundo (MOENNIG et al., 2005). No Brasil, o primeiro registro foi de Correa et al. (1968) que descreveram achados clínicos e patológicos compatíveis com a doença das mucosas, em São Paulo. O isolamento viral foi realizado, pela primeira vez, a partir de soros de bezerros coletados em abatedouro no Rio Grande do Sul (VIDOR et al., 1974). Resultados sorológicos continuaram indicando a presença do vírus nas criações no Brasil (PITUCO et al., 1997; RICHTZENHAIN et al., 1999; MELO et al., 2000, NORONHA et al., 2003).

Como em outros países, a caracterização antigênica dos isolados virais brasileiros demonstrou a diversidade dos vírus analisados. Um estudo de 10 isolados de BVDV, obtidos de cultivos celulares infectados e de animais virêmicos no Brasil, usando um painel de 25 anticorpos monoclonais e a técnica de coloração por imunoperoxidase, conseguiu classificar os isolados em dois grupos distintos entre si (OLIVEIRA, 1996). Em estudo similar, mas usando um painel diferente de monoclonais e teste de imunofluorescência, Botton et al. (1998) também encontraram diversidade no perfil antigênico de 19 isolados virais obtidos de soro de fetos e casos clínicos. Esse estudo ainda chamou a atenção para as implicações da diversidade antigênica no diagnóstico, planejamento de medidas de controle e imunizações para a virose. Apropriadamente também questionou a validade de usar vacinas importadas (BOTTON et al., 1998).

Por outro lado, a realização de análises moleculares dos isolados virais brasileiros, tem permitido estudos filogenéticos e continuam demonstrando a grande variabilidade genética viral presente no País (CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2000; FLORES et al., 2002; VILCEK et al., 2004; CORTEZ et al., 2006; LUNARDI et al., 2008).

Com relação à sorologia em amostras de leite, Scherer et al. (2002) realizaram uma pesquisa pioneira no Brasil para identificação de anticorpos contra o BVDV por teste soroneutralização rápida, em amostras individuais de leite e de soro de 12 rebanhos leiteiros da região central do Rio Grande do Sul. Esse teste foi capaz de identificar

anticorpos para BVDV em 76,9% das amostras individuais de leite. Em outro estudo, a pesquisa de anticorpos foi realizada por teste de ELISA e investigou 10 rebanhos dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. A análise envolveu amostras individuais de soro e leite de 376 vacas e também as amostras coletivas (tanque de leite) dos seus respectivos rebanhos. Os resultados individuais demonstraram que todos os rebanhos apresentavam vacas soropositivas, mas somente quatro deles possuíam mais de 80% das amostras individuais positivas. Essas criações, com alta prevalência de vacas soropositivas, também puderam ser identificadas por análise das amostras coletivas (DIAS & SAMARA, 2003).

Com relação a estudos de prevalência de BVDV no Brasil, existem quatro trabalhos relevantes. Todos utilizaram análise individual de soros para pesquisa de anticorpos para BVDV e estimaram prevalências individuais para virose de 56%, 29%, 22% e 66% (CANAL et al., 1996; POLETTO et al., 2004; THOMPSON et al., 2006; QUINCOZES et al., 2007). É interessante destacar que, apesar de usarem diferentes metodologias e analisarem diferentes tipos de criações, em regiões geográficas distintas, encontraram resultados similares de prevalência de rebanho para enfermidade que foram respectivamente 90%, 68%, 89% e 82% (CANAL et al., 1996; POLETTO et al., 2004; THOMPSON et al., 2006; QUINCOZES et al., 2007).

Vale ressaltar que o estudo de Thompson et al. (2006) analisou somente rebanhos com mais de 50 animais e também considerou a distribuição espacial da virose. Esse trabalho encontrou rebanhos soropositivos para BVDV em todos os municípios investigados das três diferentes áreas ecológicas do Estado da Paraíba, comprovando a ampla distribuição da infecção naquele Estado.

Já o estudo de Quincozes et al. (2007) introduziu a análise de fatores de risco associados à enfermidade e identificou correlação positiva com exploração mista, criação extensiva, ordenha mecânica, inseminação artificial com repasse de touro e assistência veterinária. A população estudada pertencia a propriedades de gado de corte, mistas e de leite dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí, localizados na Mesorregião do Sudeste Rio-grandense, no RS. A ampla distribuição do BVDV no cone sul da América do Sul também foi comprovada em estudo realizado no Uruguai, onde um inquérito sorológico nacional identificou anticorpos por ELISA em amostras individuais de soro de bovinos em 100% dos rebanhos de gado de corte (GUARINO et al., 2008).

2.12 Controle e erradicação

A vacinação contra BVDV é praticada rotineiramente para controlar a doença em novilhas e vacas, mas sua utilização, como medida de controle exclusiva, não foi capaz de diminuir a prevalência da infecção no Reino Unido, após 20 anos de intensa utilização (PATON et al., 1998). É possível que a vacinação não tenha sido aplicada com rigor suficiente para causar impacto significativo no nível de vírus circulante nos países onde foi usada (FRAY et al., 2000). Sua utilização é recomendada principalmente para a imunização de fêmeas suscetíveis antes da temporada de cobertura. Essa medida auxiliar é indicada para prevenir a transmissão via transplacentária e consequente geração de animais persistentemente infectados (MOENNIG et al., 2005). Por outro lado, a vacinação de bezerros é indicada para prevenção de doenças respiratórias e digestivas severas. As vacinas podem ser vivas ou inativadas, sendo que as vacinas vivas conferem boa imunidade, mas causam viremia e não devem ser utilizadas em reprodutores. Já as vacinas inativadas são mais seguras, porém conferem imunidade menos protetora e precisam de reforço anual. As falhas vacinais mais importantes estão relacionadas com a diversidade antigênica do BVDV e o mais indicado é que as vacinas contenham amostras ou antígenos virais semelhantes àqueles presentes na região em que vai ser usada (FULTON et al., 2003; HOUE et al., 2006; FULTON et al., 2009b). No Brasil, a vacinação é pouco utilizada, e somente as vacinas inativadas podem ser comercializadas (FLORES et al., 2005; BRASIL, 2009).

As vantagens econômicas e a tecnologia necessária para erradicar o vírus nas fazendas, regiões e países tem sido amplamente demonstradas (HEFFERNAN et al., 2009). Os recentes avanços nas técnicas laboratoriais contribuíram positivamente para as campanhas de controle e erradicação de BVDV em outros países. A combinação de diferentes técnicas de ELISA, imunistoquímica e biologia molecular melhoraram o diagnóstico individual e coletivo da virose (HOUE et al., 2006).

O ponto central do exitoso modelo escandinavo de controle e erradicação do BVDV consiste em evitar sistematicamente a infecção persistente. Para isto, preconiza identificar e remover todos os bovinos PIs existentes nos rebanhos e prevenir a geração de novos PIs através de medidas de biossegurança regionais ou nacionais (LINDBERG & ALENIUS, 1999). Esse modelo conseguiu reduzir e eliminar o vírus de criações de bovinos na Dinamarca, Finlândia, Noruega e Suécia, sem o uso de vacinação, e tem

influenciado as políticas de controle de BVDV em vários países. Entretanto, as características dos locais, dos tipos de criação, das espécies de hospedeiros e dos vírus envolvidos em cada região devem ser consideradas no planejamento de campanhas para outras zonas (MOENNIG et al., 2005; MARS & VAN MAANEN, 2005; VAN CAMPEN, 2009).

A erradicação oferece a grande vantagem de melhorar a saúde do rebanho, mas cria uma população de hospedeiros suscetível que necessita ser protegida por medidas de biossegurança (FRAY et al., 2004; MOENNIG et al., 2005; ROSSMANITH et al., 2005; KRAMETTER-FROETSCHER et al., 2009).

2.13 Carrapato bovino

Os carrapatos são aracnídeos encontrados em todos os continentes. O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, popularmente conhecido como carrapato bovino, é um carrapato pertencente à família *Ixodidae*, que compreende os *hard-ticks* ou carrapatos duros. Encontra-se distribuído entre os paralelos 32° Norte e 35° Sul, ou seja, nas regiões tropicais e subtropicais, zona que compreende principalmente países em desenvolvimento e importantes áreas de produção de carne bovina como, por exemplo, América Latina e Oceania (GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA, 2009; RECK JUNIOR, 2009).

O *R. microplus* é considerado o mais importante parasito de animais domésticos da América Latina, porque causa danos aos bovinos, principalmente pela espoliação de grandes quantidades de sangue, pelo desconforto da picada e pela modulação local e sistêmica da hemostasia. O carrapato bovino também é motivo de preocupação por ser o vetor do complexo causador da tristeza parasitária bovina, um complexo de doenças causadas por infecções pelos protozoários *Babesia bovis* ou *B. bigemina* e pela bactéria *Anaplasma marginale*. A tristeza parasitária é a principal causa de morte de bovinos no RS (GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2004; RECK JUNIOR, 2009).

Os vírus transmitidos por carrapatos são menos estudados do que aqueles transmitidos por insetos e vírus pertencentes às famílias *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae* e *Bunyaviridae* já foram isolados em *R. microplus* (LABUDA & NUTTALL, 2004). Mais recentemente, o vírus da febre aftosa foi identificado e isolado em *R. pulchellus* (SANG et al., 2006). Insetos hematófagos são considerados vetores mecânicos na

transmissão indireta do BVDV (TARRY et al., 1991), mas o papel de outros artrópodes hematófagos, como o carrapato, ainda não havia sido investigado até o momento.

Como o BVDV e o *R. microplus* estão amplamente disseminados nas criações de bovinos do Brasil e não existem trabalhos relacionados à transmissão viral por esse carrapato, existe interesse em investigar a possibilidade desse tipo de associação. Vale ressaltar que, até hoje, o risco de contágio de BVDV relacionado a carrapatos resume-se à utilização de animais PIs como doadores de sangue destinado à premunicação de bovinos sem contato prévio com o carrapato ou aos patógenos a ele associados (BOCK et al., 1997).

Quase a totalidade dos rebanhos de bovinos no Brasil enfrenta, em diferentes graus, problemas devido à infestação por carrapato. As raças bovinas de origem européia (*Bos taurus taurus*) são mais suscetíveis ao *R. microplus* do que as raças de origem asiática, como os zebuínos (*Bos taurus indicus*) que apresentam um maior equilíbrio na dinâmica populacional do parasito e menor efeito em seu organismo (MARTINS, 2004; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

A infestação por carrapatos parece adquirir particular importância, onde a presença predominante de gado de raças de origem européia torna o rebanho muito sensível à infestação por carrapato e aos seus efeitos deletérios. Este problema também é marcante nos rebanhos leiteiros de todo o Brasil, onde há grande predominância de gado *Bos taurus taurus* das raças Holandesa e Jersey (GONZÁLES, 2003; MARTINS, 2004; IBGE, 2009b).

A principal forma de combater *R. microplus* é o controle químico, baseado no uso de acaricidas. As práticas de manejo como períodos estratégicos para aplicação de acaricida, rotação de pastagens e integração pecuária-lavoura, também auxiliam o controle da população de carrapatos, e assim, aumentam o intervalo entre aplicações e previnem o surgimento de resistência aos princípios ativos (MARTINS, 2004; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados, bem como os materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos, serão apresentados a seguir na forma de três artigos científicos como segue:

1- Herd-level ELISA prevalence of bovine viral diarrhea antibodies in bulk tank milk of dairy herds in Southern Brazil

Almeida, L.L.; Rodenbusch, C.R.; Marks, F.S.; Costa, E.F.; Kaplan, L.H.; Corbellini, L.G.; Canal, C.W.

Submetido: *Preventive Veterinary Medicine*, em Outubro de 2009.

2- Estabelecimento de teste de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detecção do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em amostras de tanque de leite

Almeida, L.L.; Rodenbusch, C.R.; Marks, F.S.; Corbellini, L.G.; Canal, C.W.

Submetido: *Ciência Rural*, em Dezembro de 2009.

3- Detecção do vírus da diarréia viral bovina em carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em bovino persistentemente infectado

Almeida, L.L.; Marks, F.S.; Reck Junior, J.; Silva, A.S.; Gomes, D. C.; Vaz Junior, I.S.; Driemeier, D.; Canal, C.W.

Acta Scientiae Veterinariae, “Short communication”, Pub. 980. No prelo, 2009.

3.1 Herd-level ELISA prevalence of bovine viral diarrhoea antibodies in bulk tank milk of dairy herds in Southern Brazil

Laura Lopes de Almeida¹, Carla Rosane Rodenbusch¹, Fernanda Simone Marks¹, Eduardo de Freitas Costa²; Luiz Henrique Kaplan³; Luis Gustavo Corbellini², Cláudio Wageck Canal^{1*}

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Laboratório de Epidemiologia Veterinária (EPILAB), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Cooperativa dos Suinocultores de Encantado (COSUEL), Encantado, RS, Brazil,

Abstract:

A survey of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) from the 300 dairy herds was carried out testing for antibodies to BVDV using a commercial indirect ELISA kit. Bulk tank milk samples were collected in the central area of the State of Rio Grande do Sul, Brazil, in 2009. The sample to positive ratio (S/P) was calculated by using the optical density (OD) measured at 450 nm and cut-off was 0.2. Eighty samples were positive (apparent prevalence of 26.7%, 95% CI 22.1%-31.2%); true herd-level prevalence of BVDV was 25.7% (95% CI 21.2% - 30.1%). This work identified the presence of BVDV infection and estimated a low prevalence in a population of small dairy herds raised in semi-intensive system of milk production, not using specific BVDV control measures. The number of average milk cow production, cow density (ratio cow/hectare), technological index and supplier of semen presented no association with BVDV infection, but herd size was positively correlated with the infection. The low prevalence present in this population may be a favorable condition to launch a BVDV control program in them.

Key words: Bovine viral diarrhoea virus; Bulk tank milk; Antibody; Epidemiology survey, Prevalence; Brazil

*Corresponding author: Cláudio Wageck Canal

E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br (C.W. Canal)

Introduction

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a *Pestivirus* of worldwide occurrence. Different studies demonstrated that BVDV infection in dairy herds can negatively influence reproductive performance, herd health and milk production (Lindberg and Alenius, 1999), and its control may represent a robust economical benefit (Valle et al., 2005).

Persistently infected (PI) cattle play a key role in the epidemiology of the disease because they are important excretors of the virus and induce high levels of antibodies in exposed animals. Serological analysis can easily detect herds with PI animals by the presence antibodies in serum or milk (Houe, 1992; Niskanen, 1993).

The majority of the studies showed somewhat similar individual prevalences of 60% and 85% of antibody positive cattle (Houe, 1999). However, the seroprevalence in non-vaccinated herds can vary from 14.6 to 100% in different regions (Niskanen et al., 1995; Houe et al., 1995, Paton et al., 1998, Thobokwe et al., 2004). Local factors, as differences in cattle population structure, housing systems, management practice, cattle density, herd-to-herd contact, herd size and livestock trade influence in the prevalence of the disease (Houe, 1999).

Herd diagnosis of BVDV is important to prevent viral dissemination to non-infected herds and to decide about specific management measures to be performed at herd level such as purchase of animals, vaccination, quarantine and others (Lindberg and Houe, 2005). Antibody detection in bulk tank milk samples is representative of the immune status of the herd to BVDV and is a non-invasive, inexpensive and easy approach to obtain samples (Niskanen, 1993). This sampling technique has been widely used as preliminary herd screening test in BVD control and eradication programs in dairy herds (Valle et al., 2005; Rossmanith et al., 2005).

Brazil has a population of 204 million cattle, among which 20 million are dairies, and the country is the biggest exporter of beef meat worldwide. Dairy production has economic and social importance, is essentially directed to the Brazilian domestic market and its activities involve around 5 million people overall (Zoccal et al., 2006, IBGE, 2009). When compared to international standards, average productivity of Brazilian herds is low. However, modernization of dairy production in the last 10 years has contributed to boost production, reaching 26.1 billion liters in 2007. Presently the

country is the sixth largest world milk producer and has a potential for substantial improvement in productivity, especially regarding health control (EMBRAPA, 2009). An adequate planning of BVDV control and epidemiological surveys are seldom conducted in Brazil, and most of available information refers to case or outbreak reports (Flores et al., 2005). There are few epidemiological studies describing BVDV in Brazil: individual seroprevalence was 56%, 29.4% and 22.2%, and herd-level seroprevalence was higher; 90%, 68% and 89%, respectively (Canal et al., 1998; Poletto et al., 2004; Thompson et al., 2006). These results suggest that BVDV infection is widespread in Brazil as much as it is in other endemic zones elsewhere, but there is still a lack of exploratory epidemiological studies on BVDV in the herds of this country.

The objective of the cross-sectional study was to determine dairy herd-level prevalence of BVDV in the central area of the Rio Grande do Sul State in Brazil, using an indirect ELISA for detection of antibodies in bulk tank milk samples.

Materials and methods

Target population and data collection

Rio Grande do Sul (RS) is the southernmost state of Brazil and has a total area of 28,206,200 hectares, divided into 496 municipalities (IBGE, 2009). Cattle population is 13,516,426 animals and among them 1,325,354 are dairy cows (IBGE, 2007). With 7 well-defined regions, RS is the second Brazilian state in milk production (Zoccal et al., 2006).

The present study was carried out in the “Mesorregião Centro Oriental Rio-grandense” (the term “mesorregião” defines a third-level administration area, an intermediate between state and micro-region), which is located in central RS. The climate is subtropical wet; the biome is classified as rain forest (Mata Atlântica) and it is located between 43 to 500 meters above the sea level. This area has a density of 14.7 bovine/km² and contains 127,572 dairy cows with an average productivity of 2,460 liters/cow/year raised primary in small-scale farming (Zoccal et al., 2006; IBGE, 2009).

A preliminary contact with the chief veterinarian and administrative staff of the cooperative was carried out, which agreed to take part in the project. As stipulated in this agreement, information about management and production of individual farms would be retrieved from the files of the cooperative. The target population comprised a cooperative of 1,656 dairy herds distributed across 38 municipalities within the region.

The average (\pm SD) animals per herd is 21.34(\pm 14.96), lactating cows per farm is 9.8 (\pm 7.91) with a production of 15.9 liters/cow/day; farms have an average of 6.8 (\pm 4.5) hectare for raising cattle. Revenues obtained from milk production are complemented by agriculture and rearing of chicken or swine. The system of milk production is semi-intensive; the animals are fed in pastures and receive feed complement of corn silage, concentrated diet and mineral salts. Most of the cows belong to the Friesian breed and replacement rate varies between 20 to 25% per year, male calves are sold in the first days of life, and females are reared locally as replacements. Heifers are also bought from neighbors or breeders from other areas of the state. Cattle herds are vaccinated against foot-and-mouth disease, brucellosis and clostridiosis. Tuberculosis is routinely controlled and veterinarians and other technical staff of the cooperative give assistance to the farmers. There is no specific BVDV control plan and owners of herds with abortion outbreaks are advised to use polyvalent vaccine for important abortifacient and respiratory diseases, such as bovine viral diarrhea virus, bovine herpesvirus 1, parainfluenza virus type 3, bovine respiratory syncytial virus and *Leptospira* sp. Artificial insemination is used at all farms and commercial semen is obtained from 3 different genetic suppliers. Mechanical milking is carried out twice a day. The milk is kept in bulk tanks or cans under refrigeration. Production is collected each 24 or 48 hours, depending on the amount of production of each farm, and milk is transported in tank lorries.

Studied population and sampling

A frame list of farms ($N = 1,656$) as well as general information about management and production of individual farms was provided by the cooperative and only non-vaccinated herds were included. Sample size was calculated considering an absolute precision of 5% and an expected prevalence of 60% (Houe, 1999). The approximate sample size required to estimate prevalence in the target population with a 95% level of confidence was 300. A simple random sampling using computer-generated random numbers (EPINFO6) was employed to select the dairy herds. The confidence interval was adjusted since the sampling fraction " $f = (n/N)$ " was larger than 10% (i.e. 18%). This adjustment was made multiplying the numerator $p \cdot (1-p)$ of the standard deviation by $1 - f$ (Thursfield, 2007).

Aliquots of bulk tank milk (BTM) were obtained from samples routinely collected from milk tanks of every producer and submitted to the laboratory for routine

quality control analysis in May 2009. During sampling and transportation, raw milk was kept under refrigeration at 2 to 8°C without preservers. Following overnight rest, a 1.2 mL of skim milk was collected and kept frozen until analysis.

ELISA and interpretation

The commercial indirect ELISA kit (IDEXX HerdChek™ ELISA kit) was used for detection of antibodies to BVDV in BTM, according to the instructions of the manufacturer. The absorbance at a single wavelength of 450 nm (A_{450}) was determined using a spectrophotometer Asys Expert Plus (Asys Hitech GmbH, Austria). The sample to positive ratio (S/P) was calculated by using the optical density (OD) from the test sample and a positive control media, corrected for the OD of negative control media A_{450} . The cut-off recommended by the manufacturer for milk samples was that S/P ratio values under 0.2 should be classified as negative and samples with S/P values greater than or equal to 0.2 should be classified as positive for BVDV antibodies. According to manufacturer, the sensitivity (SE) of the test is 100% and the specificity (SP) is 99.5% (IDEXX, 2009). These test parameters were used to calculate the true prevalence (TP) according to the following formula (Thrusfield, 2007):

$$TP = \frac{AP + SP - 1}{SE + SP - 1} \quad (1)$$

Where AP means apparent prevalence.

Statistical analysis

Logistic regression was used to verify the relationship between herd BVDV serological status and the following variables: herd size (discrete), average dairy cow milk production (continuous), cow density per farm (continuous), supplier of semen (categorical), and a technological index (dichotomic), which was based on the type of milk storage after production (milk cans or bulk tanks). Logistic regression was made using SAS PROC LOGISTIC (SAS Institute Inc). Model validation was checked by the Hosmer and Lemeshow Goodness-of-Fit Test. Proportion of positive herds per classes of herd size was compared using a chi-square test for trend (Epi Info 6) to test if the prevalence increases with the number of lactating cows.

Results

Of the sampled dairy herds, 89.3% had up to 39 animals (average and mode of 21.3 and 18, respectively); frequency distribution of herd size in the studied population is shown in Figure 1. Bulk tank milk samples from the 300 herds tested resulted in 80 positive samples (apparent prevalence of 26.7%, 95% CI 22.1%-31.2%); true herd-level prevalence of BVDV was 25.7% (95% CI 21.2% - 30.1%). S/P values varied from zero to 2.02 (Figure 2).

The variable herd size was significantly associated with BVDV BMT antibodies ($P = 0.02$). Results of logistic regression are shown Table 1. The proportion of infected herds increased significantly with the increment of herd size ($P = 0.01$, Table 2).

Discussion

Herd diagnosis of BVDV is important to prevent viral dissemination to non-infected herds and to decide about specific management measures to be performed at herd level and it helps to estimate the prevalence, incidence and identification of risk factors involved in the infection in different areas, and these and other epidemiological data are essential to plan systematical control of BVDV (Lindberg and Alenius, 1999; Lindberg and Houe, 2005). In Brazil, BVDV diagnosis is seldom performed and the few data available is related to academic research work, which does not meet the needs for health control in the large dairy herd population of the country.

The present work estimated a herd prevalence of 26.7%, much smaller than previous results of epidemiological studies in Brazilian farms, where 68% to 90% of the herds were classified as positive to BVDV (Canal et al., 1998; Polleto et al., 2004; Thompson et al., 2006). Probably, specific characteristics of these populations such as production system, herd size, management techniques and type of cattle may have influenced the prevalence determined. Polleto and coworkers (2004) concentrated their analysis in a single milk producing municipality of RS, while the other works studied larger (>50 animals), non-dairy and extensive herds raised in two different Brazilian states, Rio Grande do Sul and Paraiba (Canal et al., 1998; Thompson et al., 2006).

The present BVDV study is the first carried out in an epidemiologically well-defined population of dairy cattle in semi-intensive systems in southern Brazil. Different from previous works that assessed individually collected cattle sera, this study measured

BVDV antibodies in collective samples of BTM. Because the sampled herds were not vaccinated and were not under specific BVDV control, detected antibodies may be attributed to viral infection and the low prevalence found can be associated with the small size of the herds in the investigated population.

Studies carried out in other regions and countries based on the detection of BVDV antibodies in BTM have detected much higher prevalences than the present study (between 70% and 95%) (Paton et al., 1998; Graham et al., 2001; Meléndez and Donovan, 2003; Garoussi et al., 2008, Stahl et al., 2008). However, all these studies screened larger herds (>40 animals) reared in intensive systems. On the other hand, an equally high prevalence (73%) was shown in a study of 220 smaller herds with 10 to 20 animals in Thailand. The possible origin for this large prevalence was traced to a high level of BVDV positivity in animals imported 5 years before the survey on those herds was conducted (Kampa et al., 2004). Also, a much smaller prevalence (14.6%) was found in large intensive cattle herds in New Zealand, where periodical immunization was able to decrease BVDV infection in the three regions analyzed (Thobokwe et al., 2004).

On the other hand, prevalences similar to those observed in the present work were found in the beginning of BVDV control campaign in Sweden and Austria, where 27.2% and 24.4% of the herds were positive, respectively (Niskanen et al., 1995; Rossmannith et al., 2005). Other similarities found with the campaign held in Sweden are the small size of dairy herds, with average 25.8 cows and the relationship of farmers with the class cooperative they are members of (Niskanen et al., 1995).

Other region that carried out a voluntary BVDV control campaign (Brittany, in France) displayed only 40% of dairy herds free of BVDV in 1997 (Joly et al., 2005). In spite of having small herds, with an average of 38 animals, the region revealed elevated infection pressure, explained by a raised annual incidence (10%) related to a high animal density (80.9 cows/km²).

Studies in England and Wales showed that regions with high cattle densities (39.9 to 88.5 cattle/km²) presented higher antibody titers to BVDV than regions with smaller populations (11.8 and 26.5), although the differences diminished with the increase in herd size (Paton et al., 1998). A high cattle density that reached 150-200 animals/km² in Peru was also related to a high BVDV prevalence (Stahl et al., 2008).

In the present study, the small cattle density (14.7 bovine/km²) and semi-intensive production system suggests that there is a low infection pressure, as shown in Sweden, where annual incidence of BVDV was 3.3% (Niskanen et al., 1995).

Animals from herds infected with BVDV may display two types of infection: transient or persistent. The key point to BVDV control in herds is the prevention of fetal infections at the beginning of gestation (Lindberg and Houe, 2005). When all PI animals are removed and new persistent infections are avoided, BVDV infection in herds behaves as a transient and self-limiting disease that tends to be cleaned of the virus. Field studies showed that BVDV could be eliminated from infected herds by adopting active measures of identification and systematic removal of PIs, or spontaneously — without undertaking any of such approaches — in a phenomenon called “self-clearance” (Lindberg and Alenius, 1999). This process has also been identified in herds with more than 200 cows; however, small herds have a higher chance of cleaning and frequently eliminate viral infection spontaneously without intervention (Lindberg and Alenius, 1999; Lindberg and Houe, 2005, Stahl et al., 2008).

Average size of the herds from the present study was 21.34 (\pm 14.96) animals and the results demonstrated a positive correlation between herd size and infection. The low prevalence found is most probably explained by self-clearance, since PI animals are less viable, can be aborted, die, be sold or culled before starting a new persistent infection in the herd (Lindberg and Alenius, 1999). Management practices used by producers as suggested by the cooperative and that were driven toward productivity may also have contributed to viral elimination in the population under study. Origin of the semen did not show association with the infection. Semen used in the cooperative was from commercial sources that had high standards of health monitoring and control. Other parameters analyzed, such as cow density (ratio cow/hectare) and technological index were not associated with BVDV infection. This may be due to type II error or smaller herds tend to have higher cow density. Other husbandry and biosafety measures used in the studied population may have also influenced the prevalence found and further studies are necessary to detect them.

In the present study, ELISA was chosen to assay antibodies because it is simple, fast, cheap and satisfactory to screen large number of samples. Milk sampling was chosen because the results are representative of the infection of the herd and samples are easily obtained (Niskanen, 1993; Beaudeau et al., 2001). BTM screening is a low-cost alternative for serology when compared to the spot test (Houe, 1992), which is more

precise but more laborious and costly, as it demands collection and examination of individual sera (Valle et al., 2001).

BTM ELISA detected active infection in the tested dairy herds and the low prevalence present may serve as a stimulus for launching voluntary programs of BVDV control in the region. Estimation and reporting of the detrimental effects of BVDV infection may be useful to convince farmers of the need to invest in control measures, and is also essential to determine the economic benefits and costs associated with a disease-free status.

Conclusion

The present work identified the presence of BVDV infection and estimated a prevalence of 26.7% of positive herds (95% CI between 21.7% and 31.7%) using ELISA in BTM in a population of small dairy herds raised in a well-defined semi-intensive system of milk production, not using specific BVDV control measures. Herd size presented positive correlation with infection. The small prevalence present in this population may be a favorable condition to launch a BVDV control program in them.

Acknowledgements

Financial support was provided through the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), FAPERGS, CAPES and Propesq/UFRGS. We are also thankful to the technicians of the cooperative who helped in the collection of the samples and to Heber Hein for helping with the data bank.

References

- Beaudeau, F., Belloc, C., Seegers, H., Assié, S., Joly, A., 2001. Assessing the within herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet. Rec.* 149, 236–240.
- Canal, C.W., Strasser, M., Hertig, C., Masuda, A., Peterhans, E., 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63, 85-97.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite, 2009. Available at <http://www.cnpqgl.embrapa.br/informativo.html>. (accessed 09.02.09).

Flores, E.F., Weiblen, R., Vogel, F.S.F., Roehle, P.M., Alfieri, A.A., Pituco, E.M., 2005. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil- histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25, 125-134.

Garoussi, M.T., Haghparast, A., Estajee, H., 2008. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bulk tank milk of industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran. *Prev. Vet. Med.* 84, 171–176

Graham, D.A., German, A., McLaren, I.E., Fitzpatrick, D.A., 2001. Testing of bulk tank milk from Northern Ireland dairy herds for viral RNA and antibody to bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 149, 261–265.

Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. *Applied Logistic regression*, second ed. New York: John Wiley, 373p.

Houe, H., 1992. Serologic analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 53, 320–323.

Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64, 89–107.

Houe, H., Baker, J., Maes, R., Wuryastuti, H., Wasito, R., Ruegg, P., Lloyd, J., 1995. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in 2 counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 321–326.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2007. *Pesquisa pecuária municipal, efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho, Brasil*. Available at <http://www.sidra.ibge.gov.br>. (accessed 09.03.09).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2009. *Informações demográficas cidades, Brasil*. Available at <http://www.ibge.gov.br/cidadesat>. (accessed 08.17.09).

IDEXX Laboratories, 2009. HerdChek™ bovine viral diarrhoea virus antibodies. Available at http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/livestock-poultry/0964189.pdf. (accessed 04.27.09).

Kampa, J., Stahl, K., Moreno-Lopez, J., Chanlun, A., Aiumlamai, S., Alenius, S., 2004. BVDV and BHV-1 infections in dairy herds in northern and northeastern Thailand. *Acta Vet. Scand.* 45, 181–192.

Joly, A., Fourichon, C., Beaudeau, F., 2005. Description and first results of a BVDV control scheme in Brittany (western France). *Prev. Med. Vet.* 72, 209–213.

Lindberg, A., Alenius, S., 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* 64, 197–222.

Lindberg, A., Houe, H., 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72, 55–73.

Meléndez, P., Donovan, A., 2003. Herd-level ELISA seroprevalence of bovine viral diarrhoea antibodies in bulk-tank milk in Chilean dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 60, 237–241.

Niskanen, R., 1993. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.* 133, 341–344.

Niskanen, R., Emanuelson, U., Sundberg, J., Larsson, B., Alenius, S., 1995. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. *Prev. Vet. Med.* 23, 229–237.

Paton, D.J., Christiansen, K.H., Alenius, S., Cranwell, M.P., Pritchard, G.C., Drew, T.W., 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.* 142, 385–391.

Polleto, R., Kreutz, L.C., Gonzales, J.C., Barcellos, L.J.G., 2004. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural* 34, 595–598.

Rossmannith, W., Janacek, R., Wilhelm, E., 2005. Control of BVDV-infection on common grassland—the key for successful BVDV-eradication in lower Austria. *Prev. Vet. Med.* 72, 133–137.

SAS, 2004. Proc Logistic, SAS Software version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Stahl, K., Lindberg, A., Rivera, H., Ortiz, C., Moreno-López, J., 2008. Self-clearance from BVDV infections-A frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru. *Prev. Vet. Med.* 83, 285–296.

Thobokwe, C., Heuer, C., Hayes, D.P., 2004. Validation of a bulk tank milk antibody ELISA to detect dairy herds likely infected with bovine viral diarrhoea virus in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 52, 394-400.

Thompson, J.A., Leite, R.M.H., Gonçalves, V.S.P., Leite, R.C., Bandeira, D.A., Herrmann, G.P., Moreira, E.C., Prado, P.E.F., Lobato, Z.I.P. Brito, C.P.T., Lage, A.P., 2006. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 76, 290–301.

Valle, P.S., Martin, S.W., Skjerve, E., 2001. Time to first calving interval in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) sero-converted dairy herds in Norway. *Prev. Vet. Med.* 51, 17–36.

Valle, P.S., Skjerve, E., Martin, S.W., Larssen, R.B., Østera, O., Nyberg, O., 2005. Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev. Vet. Med.* 72, 189–207.

Zoccal, R., Assis, A.G., Evangelista, S.R.M., 2006. Distribuição geográfica da pecuária leiteira no Brasil. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 8p. Available at <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/publicacoes/circular/CT88.pdf>. (accessed 07.16.09).

Thrusfield, M., 2007. *Veterinary Epidemiology*. third ed. Blackwell Science Publication, 610p.

Table 1

Results of logistic regression – Herd characteristics associated with BVDV in 300 dairy herds in Southern Brazil, 2009.

| Variable | Estimate | <i>P</i> -value | OR , 95% CI |
|----------------------------------|----------------|-----------------|-------------|
| Herd size ^a | 0.02 | 0.008 | 1.01 – 1.04 |
| Average milk cow production | 0.03 | 0.247 | 0.97 – 1.09 |
| Cow density (ratio cow: hectare) | -0.11 | 0.231 | 0.74 – 1.07 |
| Supplier of semen | | | |
| A | 0.11 (A vs C) | 0.680 | 0.25 – 4.24 |
| B | -0.17 (B vs C) | 0.527 | 0.19 – 3.24 |
| C | - | - | - |
| Technological index | 0.29 | 0.258 | 0.80 – 2.24 |

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^a Hosmer and Lemeshow Goodness-of-Fit Test *P*= 0.43

Table 2

Relationships, expressed as odds ratio (OR) between herd class and prevalence in 300 dairy herds in Southern Brazil, 2009.

| Class (Herd Size) | Class limit | No Positive | No Total | Prevalence | OR |
|-------------------|-------------|-------------|----------|------------|------|
| 1 | 5-11 | 6 | 27 | 22.2% | 1.00 |
| 2 | 12-18 | 25 | 105 | 23.8% | 1.09 |
| 3 | 19-25 | 16 | 76 | 21.1% | 0.93 |
| 4 | 26-32 | 12 | 40 | 30.0% | 1.50 |
| 5 | 33-39 | 6 | 20 | 30.0% | 1.50 |
| 6 | 40-46 | 6 | 12 | 50.0% | 3.50 |
| 7 | >46 | 9 | 20 | 45.0% | 2.86 |
| Total | - | 80 | 300 | - | - |

P = 0.01

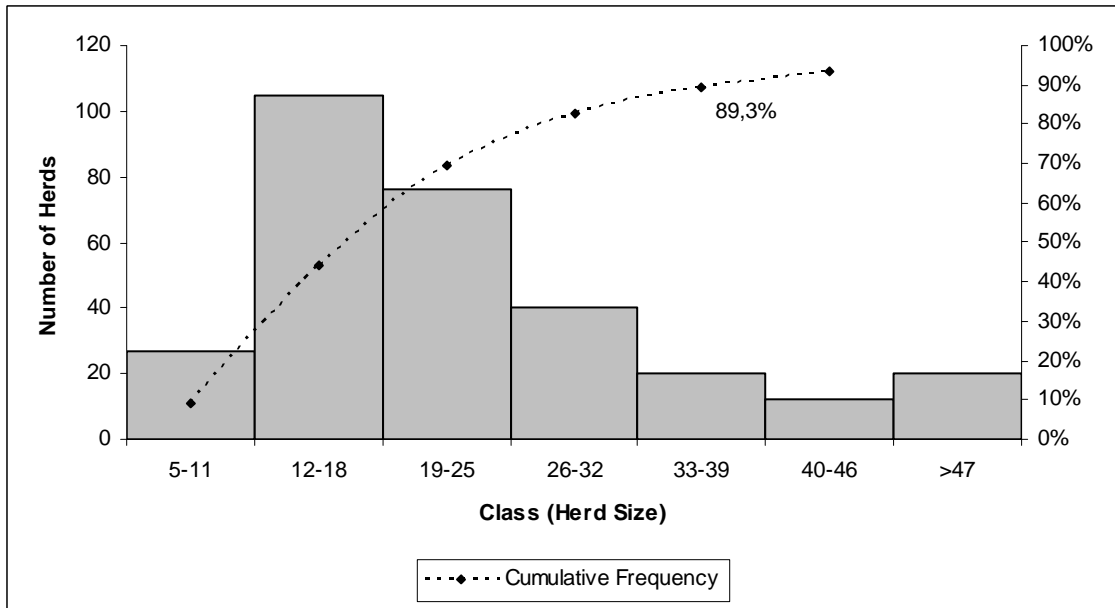


Figure 1
 Frequency of distribution of herd size in 300 dairy herds in Southern Brazil, 2009.

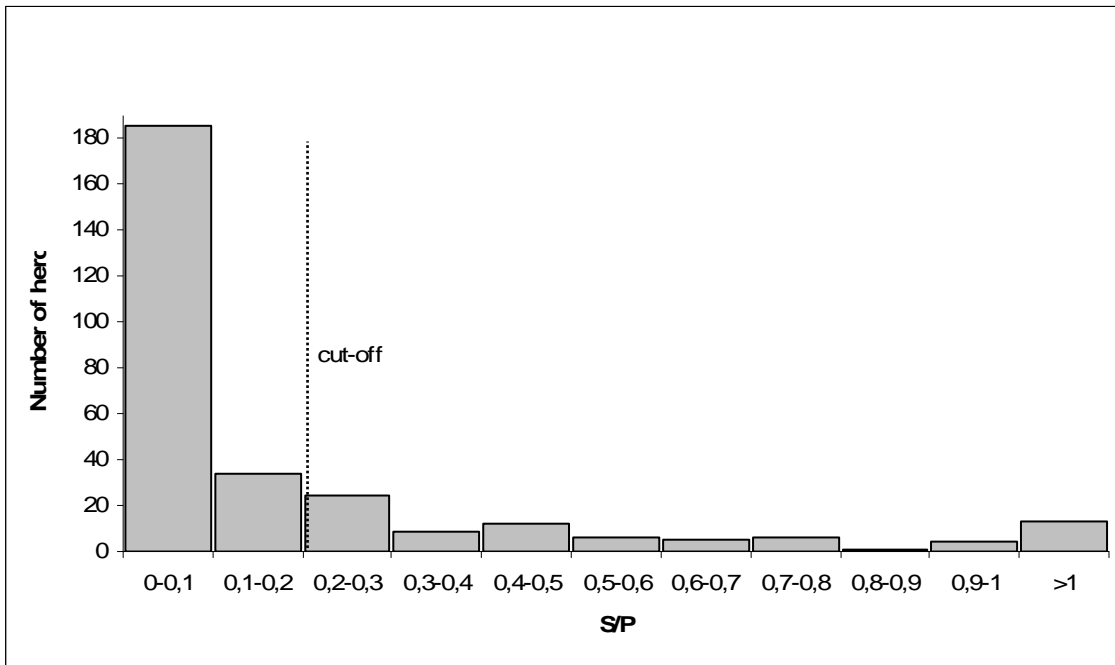


Figure 2
 Distribution of sample/positive (S/P) in bulk tank milk as measured in an indirect ELISA BVDV antibody test (IDEXX Laboratories) collected in 300 dairy herds in Southern Brazil, 2009.

3.2 Estabelecimento de teste de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detecção do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras de tanque de leite

Development of a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) test for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk samples

Laura Lopes de Almeida¹, Carla Rosane Rodenbusch¹, Fernanda Simone Marks¹, Luís Gustavo Corbellini², Cláudio Wageck Canal^{1*}

- NOTA -

RESUMO

Um teste de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi estabelecido para detecção do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras de tanque de leite. Para amplificação de um fragmento da região 5' não traduzida do genoma viral, o RNA total das amostras de leite foi extraído por TRIzol®LS e as reações de RT-PCR foram realizadas utilizando kit comercial. No ensaio de sensibilidade *in vitro*, utilizando leite artificialmente contaminado com BVDV, o teste foi capaz de detectar até 0,001 TCID₅₀ de BVDV por mL de leite. Na análise de amostras de campo, o teste identificou RNA viral em dois rebanhos de 59 suspeitos de infecção por BVDV. Esses resultados demonstraram uma sensibilidade analítica 100 ou 1000 vezes superior aos testes de RT-PCR convencionais, descritos anteriormente para leite, e comprovaram sua capacidade de identificar amostras naturalmente infectadas. Este teste é uma alternativa rápida e sensível para identificação de rebanhos com infecção por BVDV em amostras coletivas e poderá ser utilizado na monitoria de criações de gado de leite.

Palavras-chave: BVDV, RT-PCR, leite controle, diagnóstico, controle.

¹ Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540.000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br *Autor para correspondência.

² Laboratório de Epidemiologia (EPILAB), FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT

A reverse transcription test followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) was established for the detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in bulk tank milk samples. For amplification of one fragment of the 5' non-translated region of the viral genome, total RNA was extracted with TRIzol™LS followed by RT-PCR using a commercial kit. In the *in vitro* sensitivity test using milk spiked with BVDV, the test was able to detect up to 0.001 TCID₅₀ of BVDV per mL of milk. In the analysis of field samples, the test detected viral RNA in two herds among 59 BVDV antibody positive herds. These results demonstrated an analytical sensitivity 100 to 1000 times higher than previously described RT-PCR protocols for milk and showed capacity to identify naturally infected samples. The present test is a fast and sensitive alternative for the identification of herds infected with BVDV in collective samples and can be used in BVDV monitoring of dairy cattle.

Key words: BVDV; RT-PCR, milk, diagnosis, control.

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) é um vírus RNA de fita simples, membro do gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae*. O ponto central da epidemiologia de BVDV é a infecção persistente que se estabelece quando o feto é infectado via transplacentária no início da gestação. Os animais que nascem persistentemente infectados (PI) são importantes transmissores de vírus e mantem a infecção ativa no rebanho. A identificação de bovinos PI representa um desafio porque esses animais são raros e muitas vezes são assintomáticos (LAUREYNS et al., 2009). A análise de amostras de tanque de leite pelo método de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para identificação de BVDV, é uma opção rápida, prática e segura de testar as vacas lactantes em rebanhos leiteiros (RADWAN et al., 1995; RENSHAW et al., 2000; MARS & VAN MAANEN, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um teste de RT-PCR para detecção de BVDV em amostras de tanque de leite de bovinos.

Os 1.656 rebanhos que fornecem leite para o Laticínio Dália (Encantado, RS) haviam sido previamente amostrados para determinar a prevalência de anticorpos em tanque de leite. Para isto, haviam sido selecionados 300 rebanhos que não utilizavam

vacinação para BVDV por uma amostragem ao acaso, a partir de números gerados aleatoriamente pelo programa EPINFO6. Desses 300 rebanhos testados para presença de anticorpos contra BVDV, em teste de ELISA comercial (IDEXX Laboratories Inc., Suíça), foram selecionados 59 rebanhos que apresentaram altos títulos de anticorpos e um rebanho negativo. As alíquotas de leite destes rebanhos foram coletadas no Laboratório de Análises Físico-químicas da Empresa, a partir das amostras de tanque de expansão de cada rebanho, encaminhadas para os testes de rotina de controle de qualidade.

O leite foi submetido a um processamento inicial para retirada de gordura e concentração de células conforme descrito por RENSHAW et al. (2000). Resumidamente, 45 mL da amostra de leite cru, mantida refrigerada e sem conservantes, foi centrifugada a 1.700 x g por 15 minutos sob refrigeração para sedimentação de células e remoção de sobrenadante. A seguir, as células foram ressuspensas em 40 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M pH 7,4 e submetidas a novo ciclo de centrifugação nas mesmas condições. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspense em 1 mL de PBS, transferido para tubo de 1,5 mL e armazenado a -80°C até extração do RNA. Esta etapa foi realizada utilizando TRIzol[®]LS (Invitrogen, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante e o sedimento de RNA foi ressuspense em 50 µL de água ultrapura.

As reações de RT-PCR para amplificação da região 5' não traduzida de genoma viral foram realizadas utilizando os iniciadores 324 e 326 (VILCEK et al., 1994) e kit comercial “Superscript[®]One Step RT-PCR with Platinum[®]Taq” (Invitrogen, Estados Unidos). Para tanto, as reações foram preparadas em um volume total de 25 µL contendo 2 µL do RNA total da amostra, 40 pmol de cada iniciador e demais soluções do kit conforme recomendações do fabricante. A síntese de DNA complementar foi realizada a 50°C por 30 min. As condições da PCR foram: uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, em um termociclador modelo “Veriti[®]96-well” (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Na etapa seguinte, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% com 0,1 µg/mL de “Blue green loading dye I” (LGC Biotecnologia, Brasil), em tampão de Tris-ácido acético-EDTA (SAMBROOK et al., 1989). A visualização foi realizada sob lâmpada ultravioleta, onde foram comparados os

produtos de amplificação com tamanho esperado de 288 pares de bases com os padrões de peso molecular com escala de 100 pares de bases (Fermentas Inc., Estados Unidos).

Para determinar a sensibilidade analítica do teste de RT-PCR, as amostras de sedimento de células do leite de rebanho negativo previamente processadas, foram descongeladas e artificialmente contaminadas, antes da extração do RNA. Elas foram contaminadas com diluições seriadas de base 10 de BVDV, amostra referência NADL. O vírus utilizado foi propagado e quantificado em cultivo celular usando linhagem de rim de bovino MDBK (ATCC, CCL-22) e o método de REED & MÜENCH (1938).

A RT-PCR descrita neste trabalho foi capaz de detectar até 0,001 TCID₅₀ de BVDV, amostra referência NADL (10⁻³ TCID₅₀ de BVDV/mL de leite). O teste também detectou RNA viral em duas amostras de tanque de leite de rebanhos positivos para anticorpos contra BVDV, confirmando seu potencial para a detecção de leite naturalmente infectado.

No presente protocolo, foram utilizadas células somáticas do leite concentradas por centrifugação para extração do RNA total (RADWAN et al., 1995; DREW et al., 1999). Foi definido o volume inicial de 45 mL de leite, para concentrar o máximo de material, e ter a praticidade de utilizar um tubo para centrifugar cada amostra. Este volume é semelhante ao volume inicial de outros trabalhos (RENSHAW et al., 2000; MARS & VAN MAANEN, 2005). A região alvo da RT-PCR corresponde à extremidade 5' não traduzida do RNA viral, uma região bem conservada entre os *Pestivirus*. Os iniciadores usados são os mais frequentemente utilizados em testes de RT-PCR para BVDV (HOFFMANN et al., 2006). O RT-PCR tipo "one step" foi escolhido por ser mais simples e reduzir o risco de contaminações cruzadas entre amostras (KIM & DUBOVI, 2003).

O protocolo descrito neste trabalho apresentou uma sensibilidade 1.000 vezes superior ao isolamento viral. O teste também foi 100 ou 1.000 vezes mais sensível do que outros protocolos de RT-PCR (RADWAN et al., 1995, RENSCHAW et al., 2000; KIM & DUBOVI, 2003), apresentando a mesma sensibilidade de um protocolo de RT-PCR em tempo real para BVDV (LETELLIER & KERKHOF, 2003). Estes resultados podem ser parcialmente explicados pela grande quantidade de elementos celulares presentes na amostra de leite (RADWAN et al., 1995). Esses elementos podem ter favorecido a extração de RNA total por precipitação e, associados à utilização de RT-PCR tipo "one step" podem ter contribuído para o bom desempenho do teste. Experimentos de padronização da RT-PCR com soros bovinos previamente realizados,

demonstraram que a teste tipo “one step” foi 1.000 vezes mais sensível que a RT-PCR convencional, em duas etapas, para detectar a presença de BVDV (dados não mostrados), sugerindo que utilização de reagentes de nova geração pode melhorar a sensibilidade do teste.

Testes de detecção de anticorpos e RT-PCR em amostras de tanque de leite são amplamente utilizados na monitoria de rebanhos de gado de leite sob campanha de controle e erradicação de BVDV. A amostragem de tanque de leite é uma alternativa prática e de baixo custo para obtenção de amostra coletiva da principal categoria animal do rebanho, vacas lactantes (RADWAN et al., 1995; MARS & VAN MAANEN, 2005;). Por sua vez, a RT-PCR pode ser um teste muito sensível, mas apresenta alto custo de análise. A utilização de amostras coletivas melhora a relação custo benefício e torna o teste uma excelente opção para monitoria de rebanhos (RADWAN et al., 1995; RENSHAW et al., 2000). Vacas lactantes PI são raras, mas representam importantes fontes de infecção para o rebanho. Como esses animais secretam grandes quantidades de BVDV (aproximadamente $10^{5.5}$ TCID₅₀ de vírus por mL de leite) podem ser identificados em testes de RT-PCR em amostras de tanque de leite (RADWAN et al., 1995, KIM & DUBOVI, 2003; MARS & VAN MAANEN, 2005). Análises de campo conseguiram detectar uma vaca PI lactante em tanque de 162 (DREW et al., 1999) ou 150 vacas (KOZASA et al., 2005). Mais recentemente, a análise de tanque de leite de 800 vacas foi capaz de detectar RNA viral de duas vacas PI, identificadas em posterior análise individual (HILL et al., 2009).

O teste de RT-PCR para BVDV, descrito neste trabalho, demonstrou ótima sensibilidade e foi capaz de detectar amostras naturalmente infectadas. Este teste é uma alternativa rápida e sensível para identificação de rebanhos com infecção por BVDV, em amostras coletivas, e pode ser utilizado na monitoria de criações de gado de leite.

AGRADECIMENTOS

À Cooperativa de Suínos de Encantado (COSUEL) Laticínio Dália, por disponibilizar as amostras de tanque de leite. Este trabalho recebeu financiamento de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

DREW, T.W. et al. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.145-154, 1999.

HILL, F.I. et al. Use of molecular and milk production information for the cost-effective diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in New Zealand dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, 2009. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/vetmic>>. Acesso em: 23 nov. 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.047

HOFFMANN, B. et al. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.136, p.200–209, 2006. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jviromet>. Acesso em: 2 jan. 2008. doi:10.1016/j.jviromet.2006.05.020

KIM, S.G.; DUBOVI, E.J. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. **Biologicals**, v.31, p.103-106, 2003.

KOZASA, T. et al. Relationship of bovine viral diarrhoea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.41–47, 2005.

LAUREYNS, J. et al. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. **The Veterinary Journal**, 2009. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/tvjl>. Acesso em: 24 jul. 2009. doi:10.1016/j.tvjl.2008.11.014.

LETELLIER, C.; KERKHOF, P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**, v.114, p.21-27, 2003. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jviromet>. Acesso em: 13 jul. 2008. doi:10.1016/j.jviromet.2003.08.004

MARS, M.H.; VAN MAANEN, C. Diagnostic assays applied in BVDV control in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, p.43-48, 2005.

RADWAN, G.S. et al. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.44, p.77-92, 1995.

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

RENSHAW, R.W. et al. Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p.184-186, 2000.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2.ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

VILCEK, S. et al. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.136, p.309–323, 1994.

3.3 Detecção do vírus da diarreia viral bovina em carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em bovino persistentemente infectado

Detection of bovine viral diarrhea virus in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks fed on persistently infected cattle

Laura Lopes de Almeida¹, Fernanda Simone Marks¹, José Reck Junior², Adriana da Silva Santos³, Danilo Carloto Gomes³, Itabajara da Silva Vaz Junior⁴, David Driemeier³ & Cláudio Wageck Canal^{1*}

*Suporte financeiro recebido da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CNPq - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Entomologia Molecular e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). L.L. Almeida é doutoranda e possui bolsa CAPES. ¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Avenida Bento Gonçalves n. 9090, Bairro Agronomia, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. ²Centro de Biotecnologia, UFRGS. ³Setor de Patologia Veterinária, FAVET, UFRGS. ⁴Setor de Imunologia, FAVET e Centro de Biotecnologia, UFRGS. CORRESPONDÊNCIA: C. W. Canal [claudio.canal@ufrgs.br - Fone: +55 (51) 3308 6926].

ABSTRACT

Background: Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is one of the main agents that cause economical losses in cattle worldwide. Congenitally infected calves that are born persistently infected (PI) to BVDV are the main sources of infection to susceptible cattle. Direct contact is the most important form of transmission, but indirect contact can also spread BVDV not only inside herds, but also between them. Transmission of BVDV by haematophagous insects has experimentally been proven, but the role of ticks in the transmission of BVDV has never been investigated. Ticks can heavily infest cattle raised in tropical areas and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the most important between them. The present experiment was carried out to investigate the role of *R. microplus* ticks in the transmission of BVDV, experimentally infecting PI calf with ticks.

Material, Methods and Results: Three calves were used in the experiment: one PI calf was identified from a natural outbreak; a second animal was infested with the progeny of a tick fed on the PI calf and the third was kept as a negative control, infested with negative ticks. Viral RNA investigation was performed by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) from the sera of the calves and from ticks (adult females, eggs and larvae that were the progeny of the experimentally contaminated adult females and from the control animal). BVDV RNA was detected in tick adult females fed on the PI calf, but not in the control animal. Experimental infestation of a second cattle with larvae derived from adult females infected with BVDV was not able to produce infection. These data suggest that the virus is able to pass to ticks during feeding on the infected PI animal, but that there is no transmission by transovarial route, as viral RNA was also not detected in eggs and larvae from adult females infected with BVDV.

Discussion: Bovine tick is the most important ectoparasite in domestic animals in tropical and sub tropical areas. However, its role in transmission of viral agents, particularly BVDV, has not been previously studied. The results of our experiment suggested that adult females of *R. microplus* were not able to transmit the infection to susceptible cattle. However, a macerate of a pool of tick females fed on the PI calf was positive to BVDV. A further validation using a larger number of infested bovines would help to confirm this new finding. *R. microplus* ticks are monoxenic, but it must be considered that the males, different from females, make a non-continual process of blood sucking and may move between bovines to reproduce. Additionally, in conditions of close contact between animals, besides tick males, larvae may change hosts in the early stages of development. These facts do not permit to exclude the risk of direct spread of viral infection in the herd by a same specimen of *R. microplus*. On the other hand, the presence of virus inside females represents an environmental reservoir of BVDV, which may infect through epithelial abrasions if ingested. These considerations may be reinforced by the fact that in field conditions it has been observed that high animal density favors the fast spread of BVDV in cattle herds. Collectively, these evidences suggest that ticks would represent an additional factor to be allowed for in BVDV transmission. As a conclusion, the present study demonstrates that *R. microplus* can be contaminated with BVDV during blood feeding, strengthening the idea that haematophagous vectors can be involved in the spread of the disease. In spite of the fact that BVDV was not transmitted by the progeny of the ticks, it is not possible to discard

such form of transmission under natural conditions.

Keywords: bovine viral diarrhea virus, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tick, transmission, vector.

Descritores: vírus da diarreia viral bovina, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, carrapato, transmissão, vetor.

Received: October 2009

ww.ufrgs.br/actavet

Accepted: December 2009

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence ao gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* e é uma das principais causas de perdas econômicas na bovinocultura. A transmissão de BVDV por contato direto é a mais importante, porém a transmissão indireta também já foi observada. Produtos injetáveis contaminados, roupas e instrumentos veterinários ou o ser humano podem disseminar BVDV não somente dentro do rebanho, mas também entre rebanhos [5,10]. Sob condições experimentais, moscas hematófagas já foram capazes de transmitir mecanicamente o vírus a bovinos [16], porém a transmissão de BVDV por vetores artrópodes em condições naturais nunca foi descrita.

Por outro lado, as zonas de clima tropical e subtropical são caracterizadas por abundância de artrópodes hematófagos que estão continuamente alimentando-se em bovinos. No Brasil, o mais importante deles é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [11].

Os vírus transmitidos por carrapatos são menos estudados do que aqueles transmitidos por insetos, mas, já foram isolados em *R. microplus* vírus pertencentes às famílias *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae* e *Bunyaviridae* [6]. Mais recentemente, o vírus da febre aftosa foi identificado e isolado em *R. pulchellus* [15]. Como o BVDV está amplamente disseminado nas criações de bovinos do Brasil e não existem trabalhos relacionados à transmissão viral pelo carrapato *R. microplus*, o objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade de transmissão do BVDV por carrapatos *R. microplus* sob condições experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e desenho experimental

No presente trabalho, foram utilizados três bovinos (*Bos taurus taurus*) machos clinicamente saudáveis, com 20 meses de idade. Os animais foram mantidos estabulados individualmente, com livre acesso à comida e água, tratados conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Um destes animais era PI e foi utilizado como fonte de BVDV neste trabalho. O PI era da raça Aberdeen Angus e foi previamente identificado no teste de triagem de bezerros de um rebanho de gado de corte com surto de BVDV, no verão de 2007 e 2008. Este animal apresentava menor desenvolvimento do que seus contemporâneos e as análises laboratoriais de imunistoquímica de corte de pele e teste de Transcrição Reversa, seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), foram positivos para BVDV. Nova análise de RT-PCR, realizada 60 dias após os primeiros testes, identificou permanência de viremia e os testes sorológicos deste animal confirmaram ausência de anticorpos contra BVDV (dados não mostrados). Este PI foi infestado com 20.000 larvas de *R. microplus* da cepa Porto Alegre (livre de patógenos) com 10 dias de idade. Ao fim do ciclo de vida parasitária (aproximadamente três semanas), as fêmeas totalmente ingurgitadas (teleóginas) que espontaneamente se desprenderam do bovino e caíram no piso da baia foram coletadas, lavadas e acondicionadas em placas de Petry, sendo mantidas entre 25-28°C e 80% de umidade relativa até o término da postura dos ovos. Os ovos foram acondicionados em tubos de ensaio, pesados e mantidos nas mesmas condições das fêmeas em postura para possibilitar a eclosão das larvas.

As larvas de 10 dias de idade, oriundas da progênie das teleóginas que ingurgitaram no bovino PI foram utilizadas para infestar um segundo bovino (374), raça Hereford. Um terceiro bovino (373) da mesma raça foi infestado com larvas da mesma cepa de *R. microplus* oriundas de teleóginas ingurgitadas em um bovino não PI e foram utilizadas como controles negativos.

Foram coletadas amostras de sangue dos bovinos infestados nos dias zero, seis, 13 e 21 após infestação, os soros foram separados e estocados à -80°C até as análises. Amostras de teleóginas ingurgitadas nos bovinos acima citados, além de sua progênie de ovos e larvas, também foram coletadas e estocadas em nitrogênio líquido para extração de RNA.

Extração de RNA

A extração do RNA total das amostras de soros e carrapatos foi realizada

utilizando Trizol[®]LS¹, seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, foram utilizados 250 µL dos soros dos bovinos acima referidos. As amostras de carrapatos foram submetidas a uma preparação prévia que consistiu de maceração em grau e pistilo do material mantido congelado em nitrogênio líquido. Uma pequena quantidade do macerado, equivalente ao volume de 50 µL de amostra, foi colocado em tubo de reação com 750 µL de TRIZOL[®]LS e foi adicionada água ultrapura para completar o volume total de 1000 µL. O RNA precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura.

Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

As reações de RT-PCR, para amplificação da região 5' não traduzida de genoma viral, foram realizadas utilizando os iniciadores 324 e 326 [18] e kit comercial "Superscript[®]One Step RT-PCR with Platinum[®]Taq"². Para tanto, as reações foram preparadas em um volume total de 25 µl contendo 2 µL de RNA total da amostra, 40 pmol de cada iniciador e demais soluções do kit, conforme recomendações do fabricante. A síntese de DNA complementar foi realizada a 50°C por 30 min. As condições da PCR foram uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, realizadas em um termociclador automático modelo "Veriti[®]96-well"³. Na etapa seguinte, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% com 0,1 µg/mL de "blue green loading dye I"⁴, em tampão de tris-ácido acético-EDTA [14] para detectar o produto de amplificação com 288 pares de bases.

RESULTADOS

Infecção experimental de bovino

Nenhum sinal clínico da infecção do BVDV foi detectado no bovino 374, após a infestação com larvas da progênie dos carrapatos expostos ao bovino PI, ou no bovino 373, infestado com as larvas da progênie de carrapatos não expostos ao vírus.

Detecção de RNA viral em soros de bovinos

Os resultados da RT-PCR para amplificação de um fragmento do genoma do BVDV a partir das amostras do bovino 374, infestado com larvas da progênie de

carrapatos expostos ao BVDV, e do bovino 373, infestado com carrapatos não expostos ao vírus, foram negativos. Quando a amostra de RNA extraído do soro obtido do bovino PI foi submetida a RT-PCR observou-se amplicons com aproximadamente 288 pares de bases, indicativo da presença de RNA viral.

Deteção de RNA viral em carrapatos

Foi possível detectar RNA viral no teste de RT-PCR realizado a partir da extração de RNA total do grupo das fêmeas totalmente ingurgitadas, desprendidas do bovino PI (Figura 1). As amostras da progênie, ovos e larvas, desses carrapatos alimentados no bovino PI foram negativas na análise por RT-PCR para BVDV (Figura 1). Como esperado, as amostras dos grupos das teleóginas alimentados em bovino negativo para BVDV, bem como de seus ovos e larvas, foram negativas na RT-PCR.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a detecção de RNA viral em teleóginas que completaram seu ciclo parasitário após repasto no bovino PI confirmou a possibilidade de infecção das fêmeas de carrapatos alimentados em animais persistentemente infectados por BVDV. Os resultados também sugerem que não há transmissão transovariana, visto que a progênie destes carrapatos foi negativa na RT-PCR e não foi capaz de transmitir o vírus a um bovino negativo.

O ponto central da epidemiologia do BVDV é a infecção persistente. O animal precocemente infectado, via transplacentária, apresenta uma viremia (10^5 CCID₅₀/mL de sangue) persistente por longos períodos ou toda vida e é a principal fonte de contaminação para bovinos suscetíveis [3,7]. No Brasil, BVDV está amplamente distribuído nas criações de bovinos e estudos de prevalência estimaram uma infecção de rebanho de 90% e 82%, respectivamente [12,17].

Os artrópodes hematófagos são considerados vetores mecânicos na transmissão indireta de BVDV, mas o papel dos carrapatos ainda não havia sido investigado [16]. Campanhas de controle e erradicação de BVDV em curso em zonas de clima temperado consideram não existir risco de transmissão por vetores artrópodes e não recomendam nenhuma medida de controle específica [7]. O carrapato bovino é o ectoparasito mais importante de animais domésticos da América Latina. O *R. microplus* causa grandes prejuízos à produção animal, através de danos diretos, como anemia, e indiretos via

transmissão dos agentes do complexo tristeza parasitária bovina, *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale* [4]. Contudo, seu papel na transmissão de agentes virais, particularmente do BVDV, não havia sido estudado. Vale ressaltar que, até hoje, o risco de contágio de BVDV relacionado a carrapatos resume-se à utilização de animais PI como doadores de sangue destinado à premunicação de bovinos sem contato prévio com o carrapato ou aos patógenos a ele associados [2].

Taxonomicamente, arbovírus (arthropod-borne viruses) são um grupo heterogêneo de vírus de vertebrados unificados por uma única característica ecológica, transmissão por artrópodes hematófagos nos quais eles replicam. Esse grande grupo é formado por vírus de várias famílias, principalmente de vírus RNA. O gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, é composto por muitos arbovírus responsáveis por importantes doenças infecciosas em todo mundo, como dengue, febre amarela e doença da febre do Nilo ocidental. Arbovírus transmitidos por carrapatos são menos estudados do que aqueles transmitidos por insetos, mas sabe-se que a principal rota de transmissão viral por carrapatos infectados é através da saliva secretada durante o repasto sanguíneo [6,9]. Foi interessante um estudo de prospecção de arbovírus em carrapatos coletados de bovinos domésticos em abatedouro de Nairobi, Quênia, em que foi identificado o vírus da febre aftosa (FMDV). Apesar de não ser considerado um arbovírus, o FMDV foi identificado e isolado de *R. pulchellus*. Esse trabalho demonstrou o potencial risco de transmissão de vírus, sejam eles arbovírus ou não, por várias espécies de carrapatos em bovinos, inclusive os pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* [15].

Visto que o *R. microplus* é um ectoparasito monoxeno, a infecção de fêmeas adultas alimentadas em um bovino positivo para BVDV não representaria risco direto de transmissão para outros bovinos. Contudo, a infestação por *R. microplus* poderia estar relacionada à disseminação de BVDV no rebanho através de transmissão transovariana dos carrapatos para sua progênie [6]. Além disso, é importante ressaltar que o macho de *R. microplus*, diferentemente das fêmeas, realiza um processo de hematofagia não-contínuo e pode transitar, à procura de fêmeas não-fecundadas, entre diferentes bovinos ao longo de sua vida, parasitando diferentes indivíduos [8]. Assim sendo, este fato não permite excluir a presença de um risco direto de transmissão de agentes virais no rebanho por um mesmo espécime de *R. microplus* [13]. De fato, em condições de contato íntimo entre os animais de um rebanho, além dos machos adultos, formas larvais de *R. microplus* podem trocar de hospedeiro nos estágios iniciais de seu ciclo de vida [8]. Além disso, a presença do vírus no interior das teleóginas representa

um reservatório de presença BVDV no ambiente, que pode constituir-se em uma fonte de contaminação oral dos bovinos, como diversos outros fômites contaminados. Por sua vez, experiências de campo tem demonstrado que a alta densidade animal e condições de criação intensiva favorecem a rápida disseminação de BVDV em rebanhos bovinos [1,5]. Também é possível que a presença de carrapatos possa ser um fator adicional a ser considerado na transmissão do BVDV. De fato, experimentos estão em andamento para verificar a viabilidade e infectividade do BVDV no interior das teleóginas, bem como, para investigar a infecção de machos de *R. microplus* expostos ao BVDV.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a possibilidade de infecção do carrapato bovino *R. microplus* por repasto sanguíneo em animais PI por BVDV, confirmando a importância do estudo de vetores hematófagos na epidemiologia de agentes virais de animais domésticos. Como a transmissão via transovariana não foi confirmada, o papel do carrapato bovino na transmissão do BVDV em condições naturais continua incerto.

Notas informativas

¹TRIZol[®] LS Reagent, Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos.

²Superscript[®] One Step RT-PCR with Platinum[®] Taq, Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos.

³Veriti[®] 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos.

⁴Blue green loading dye I, LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS

- 1 **Arenhart S., Bauermann F.V., Oliveira S.A.M., Weiblen R. & Flores E.F. 2009.** Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29 (9): 736-742.
- 2 **Bock R.E, Rodwell B.J. & McCowan M. 1997.** Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in south-eastern Queensland. *Australian Veterinary Journal*. 75 (9): 656- 659.

- 3 **Brock K.V., Grooms D.L., Ridpath J. & Bolin S.R. 1998.** Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10: 22–26.
- 4 **González J.C. 2003.** *O Controle do Carrapato do Boi*. 3.ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 128p.
- 5 **Houe H. 1999.** Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*. 64: 89-107.
- 6 **Labuda M. & Nuttall P.A. 2004.** Tick-borne viruses. *Parasitology*. 129: 221–245.
- 7 **Lindberg A.L.E. & Alenius S. 1999.** Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology*. 64: 197-222.
- 8 **Mason C.A. & Norval R.A.I. 1981.** The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. *Veterinary Parasitology*. 8 (2): 185-188.
- 9 **Murphy F.A., Gibbs E.P., Horzinek M.C. & Studdert M.J. 1999.** *Veterinary Virology* 3rd. edn. San Diego: Academic Press, Elsevier, 629p.
- 10 **Niskanen R. & Lindberg A. 2003.** Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *The Veterinary Journal*, 165: 125–130.
- 11 **Parizi L.F., Pohl P.C., Masuda A., Da Silva Vaz I., 2009.** New approaches toward anti-*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick vaccine. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 18 (1): 1-7.
- 12 **Quincozes C.G., Fischer G., Hübner S.O., Vargas G.D., Vidor T. & Brod C.S. 2007.** Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*. 28 (2): 269-276.
- 13 **Romero C.H., Abaracon D., Rowe C.A. & Silva A.G. 1984.** Bovine leukosis virus infectivity in *Boophilus microplus* ticks. *The Veterinary Record*. 115 (17): 440-441.
- 14 **Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. 1989.** Agarose gel electrophoresis. In: *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp.6.3-6.13.
- 15 **Sang R., Onyango C., Gachoya J., Mabinda E., Konongoi S., Ofula V., Dunster L., Okoth F., Coldren R., Tesh R., Rosa A.T., Finkbeiner S., Wang D., Crabtree M. & Miller B. 2006.** Tickborne arbovirus surveillance in market livestock, Nairobi, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*. 12 (7): 1074-1080.

- 16 **Tarry D.W., Bernal L. & Edwards S. 1991.** Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *The Veterinary Record*. 128: 82-84.
- 17 **Thompson J.A., Leite R.M.H., Gonçalves V.S.P., Leite R.C., Bandeira D.A., Herrmann G.P., Moreira E.C., Prado P.E.F., Lobato Z.I.P., Brito C.P.T. & Lage A.P. 2006.** Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 76: 290–301.
- 18 **Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P. & Paton D.J. 1994.** Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*. 136: 309–323.

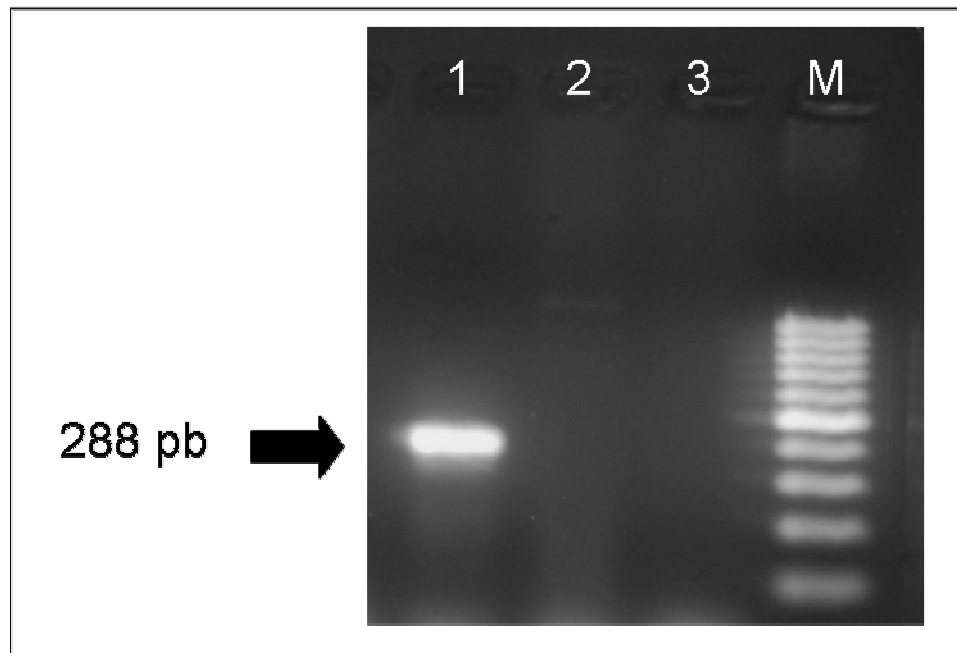


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação da RT-PCR da região 5' não traduzida do genoma viral do BVDV. Posição M corresponde a padrões de marcador molecular com escala de 100 pares de bases. Posições 1 à 3 correspondem as amostras de teleóginas, ovos e larvas de carrapato *R. microplus*, respectivamente.

4 DISCUSSÃO GERAL

Nesta Tese foram realizados três estudos, objetivando esclarecer determinados aspectos da epidemiologia e da detecção da infecção pelo BVDV.

O primeiro artigo (Item 3.1) trata de um estudo transversal da infecção por BVDV no RS. A metodologia utilizada diferiu de outros trabalhos anteriormente realizados no Brasil, principalmente porque: (a) foi escolhida e caracterizada uma população bem definida de criações de gado de leite dos associados de uma cooperativa que utilizavam sistemas de criação e técnicas de manejo semelhantes entre si; (b) a unidade da análise foi o rebanho, por isso foram coletadas e estudadas exclusivamente informações e amostras coletivas dos rebanhos; (c) o teste laboratorial empregado, um ELISA comercial, foi utilizado para detectar a presença de anticorpos na categoria animal mais importante destes rebanhos, vacas em lactação. Altos títulos de anticorpos nas amostras foram tomados como parâmetro para a classificação dos rebanhos em positivos ou negativos para a infecção recente e/ou ativa de BVDV. Por outro lado, a ausência de anticorpos foi indicativa de ausência de infecção. Esse tipo de estudo (prevalência por amostragem coletiva) é inédito no País e, por isso, seus resultados foram comparados a estudos de prevalência realizados anteriormente no Brasil e que empregaram outras metodologias, como amostragem individual, dosagem de anticorpos no soro e testes sorológicos diferentes (CANAL et al., 1998; POLLETO et al., 2004; THOMPSON et al., 2006). O atual estudo permitiu concluir que a prevalência dos rebanhos analisados para a infecção do agente foi mais baixa do que a prevalência identificada nos estudos anteriores. Pelas diferenças, tanto nas metodologias usadas como nas populações avaliadas, comparações eventualmente realizadas entre os resultados desses trabalhos devem ser cautelosas.

A comparação do estudo atual com outros executados com metodologias semelhantes de amostragem de rebanho (tanque de leite) e análise de anticorpos por ELISA (no leite), mas que foram realizados em outros países (PATON et al., 1998; GRAHAM et al., 2001; KAMPA et al., 2004; STAHL et al., 2008) pareceu mais adequada e foi utilizada na discussão do primeiro artigo. A comparação com os dados dos outros países também demonstrou que a prevalência estimada no artigo 1 (Item 3.1) foi baixa e muito semelhante à encontrada nos rebanhos na fase de pré-campanha de controle e erradicação de BVDV na Suécia (NISKANEN et al., 1995). Esse achado pode ser associado positivamente ao número total de animais no rebanho, mas não

apresentou correlação com os outros parâmetros analisados no estudo. A hipótese proposta para explicar esses achados é uma provável baixa pressão de infecção, que pode ser atribuída à baixa densidade de bovinos na região analisada no RS, ao sistema de criação semi-intensivo e as práticas de manejo adotadas pelos criadores associados da cooperativa.

Infelizmente, os parâmetros epidemiológicos necessários para a comprovação da hipótese proposta ainda não estão disponíveis no RS ou no País, principalmente, porque faltam informações essenciais sobre as diferentes regiões e tipos de criação nacionais. Com o objetivo de aprofundar o estudo da diarreia viral bovina, atualmente se encontra em curso a aplicação de um questionário epidemiológico (Anexo 1) para levantamento das características das propriedades inicialmente analisadas no artigo 1 (Item 3.1). Com esse questionário serão investigados outros parâmetros não analisados anteriormente como a movimentação de animais, o contato entre categorias animais, o contato entre rebanhos, a compra de animais de reposição, a origem genética de animais e o histórico clínico dos rebanhos. Está sendo realizada também a anotação dos pontos de georeferenciamento das propriedades avaliadas e, com essas novas informações, será possível fazer a análise da distribuição espacial da doença na área estudada. Adicionalmente, está sendo realizado o levantamento da contagem de células somáticas dos referidos rebanhos (média anual) e, então, será possível verificar se existe correlação desse importante indicador de rebanhos leiteiros com BVDV, como já foi proposto em outros trabalhos (NISKANEN et al., 1995; BEAUDEAU et al., 2005).

Em países em que os parâmetros epidemiológicos da doença vêm sendo estudados há mais tempo, existe um significativo conhecimento do assunto, embasado nas experiências de campo e nos modelos epidemiológicos desenvolvidos para BVDV. Esses estudos comprovaram que a utilização de práticas de manejo voltadas para produção, como o descarte dos bezerros machos, o descarte dos animais menos produtivos e a separação das categorias animais, contribuem para a eliminação dos animais persistentemente infectados dos rebanhos. Assim, as práticas de manejo voltadas para produção favorecem a limpeza dos rebanhos contaminados ou a erradicação da infecção nos mesmos, especialmente em criações de gado de leite (LINDBERG & HOUE, 2005; VIET et al., 2007).

No caso específico de BVDV, dois fenômenos distintos podem contribuir para a limpeza ou descontaminação do rebanho. O primeiro é o fenômeno de infecção auto-limitante ou “fade out”, um evento clássico das infecções transitórias e que ocorre

quando não existem mais animais suscetíveis ao agente infeccioso. O segundo é o “self clearance”, ou auto limpeza, um fenômeno próprio observado nas infecções pelo BVDV quando todos os animais PI são eliminados do rebanho, independente de sua condição viral. Nesse caso, ainda existem animais suscetíveis, mas a infecção dentro do rebanho se extingue, porque não existe mais infecção persistente. Aparentemente, a infecção transitória pelo BVDV não é capaz de manter a infecção ativa nos rebanhos por muito tempo (LINDBERG & ALENIUS, 1999; LINDBERG & HOUE, 2005). O fenômeno ou processo de “self clearance”, ou auto limpeza, ocorre em rebanhos grandes e pequenos, mas o “fade out” está diretamente associado ao número total de animais. A limpeza da infecção de rebanhos de leite menores de 50 animais é um achado frequente e a alta prevalência nesse tipo de rebanho está mais associada à densidade de bovinos na região, sugerindo uma alta incidência, com frequente reintrodução do BVDV nos rebanhos (JOLY et al., 2005; STAHL et al., 2008).

A hipótese proposta no primeiro artigo (Item 3.1) é que o reduzido número de animais e a alta taxa de reposição utilizada (superior a 20%) estão favorecendo a limpeza (“clearance”) da infecção dos rebanhos estudados. É provável que a limpeza seja maior do que a reintrodução da infecção e que a baixa prevalência encontrada, corresponda a um ponto de equilíbrio entre a pressão de infecção e a limpeza desses rebanhos. A doutoranda também acredita que é provável que esse equilíbrio seja tênue porque os poucos estudos de prevalência indicam que o BVDV está disseminado na Argentina, Brasil e Uruguai (JONES et al., 2001; POLETTO et al., 2004; QUINCOZES et al., 2007; GUARINO et al., 2008). Desse modo, o agente pode estar presente nas criações dessas regiões e a pressão de infecção pode aumentar a qualquer momento. Como vários fatores contribuem para a pressão de infecção (LINDBERG & HOUE, 2005; VIET et al., 2007), novas condições como, por exemplo, intensificação do sistema de criação e aumento do número total de animais por rebanho, podem resultar no aumento da pressão e, conseqüentemente, no aumento da prevalência da infecção.

Vale ressaltar que o teste de ELISA comercial utilizado no Artigo 1 (Item 3.1) não foi o mesmo das publicações internacionais citadas e não existe uma determinação científica das suas características de análise diagnóstica, como sensibilidade e especificidade para tanque de leite (GREINER et al., 2000). Por este motivo, é possível que exista um viés de análise na correlação direta dos resultados com outros ELISAs previamente avaliados e validados (NISKANEN, 1993; BEAUDEAU et al., 2001). Para investigar esta possibilidade, as amostras utilizadas no experimento serão re-analisadas

com um teste de ELISA comercial (SVANOVA, Suécia) previamente validado (NISKANEN, 1993) e amplamente utilizado nos estudos realizados em outros países. Por outro lado, para determinar a acurácia da amostragem por tanque de leite na população estudada, estão sendo coletadas amostras individuais de soro de bovinos jovens com 6 a 18 meses de idade para a realização do “spot test”, que é o padrão-ouro de amostragem de rebanhos para identificação de infecção ativa para BVDV (HOUE, 1992), de uma sub-amostragem da população analisada e que também serão avaliados no ELISA. Esses estudos permitirão análises mais detalhadas e devem gerar novos conhecimentos sobre o BVDV.

Medidas de biossegurança para prevenção de doenças de animais criados em condições confinadas são bem conhecidas e utilizadas de maneira muito intensiva nas criações de aves e suínos dos associados da Cooperativa. As criações de bovinos vem progressivamente tentando adaptar e utilizar conceitos similares, mas ainda se encontram num estágio de biossegurança bastante inferior aos adotados em aves e suínos. Existem pontos positivos, como a realização de um projeto-piloto de vigilância sorológica de brucelose e tuberculose em conjunto com o Ministério da Agricultura que envolve a investigação de todos os bovinos do município de Arroio do Meio. A difusão desse tipo de abordagem, para outras enfermidades, poderia abrir caminho para mudanças de atitudes em relação ao controle do BVDV. A rastreabilidade é outro conceito recente, o pequeno produtor conhece bem seus animais, mas a produção moderna necessita de registros mais complexos. A anotação de dados de produção dos rebanhos e dos animais, o registro de datas de parição, números de doses de sêmen por prenhez e intervalo de dias entre partos são informações importantes que são indispensáveis na monitoria adequada da saúde dos animais.

O melhoramento genético é uma conquista real da bovinocultura de leite, para a inseminação artificial existe o aconselhamento de técnicos para melhorar as características da produção e o sêmen comercial vem sendo usado como rotina. A melhoria na nutrição também é outro fator crítico para o incremento da produtividade. É mais fácil para o produtor adotar melhorias nessas áreas do que na sanidade. Por terem benefícios menos visíveis, os investimentos em sanidade precisam ser conquistados e dependem da atuação do veterinário. A diarreia viral bovina é uma doença predominantemente subclínica, somente os surtos são visíveis e estão relacionados à entrada do novo vírus em rebanho não imune. Como existe grande diversidade, o vírus pode ser parcialmente novo e o rebanho parcialmente imunizado, o que explicaria a

ocorrência comum de quadros clínicos moderados, cursando de forma branda ou assintomática. Quanto aos tipos virais também podem ser mais virulentos ou não. Certos vírus parecem determinar aspectos da patogenicidade como, por exemplo, parecem existir vírus mais patogênicos associados a abortos (BACHOFEN et al., 2009) ou a infecção testicular prolongada (GIVENS et al., 2009).

No segundo artigo (Item 3.2), os resultados obtidos com o teste RT-PCR foram muito favoráveis, demonstrando a potencialidade do uso do teste nas condições do Brasil. O teste também pode ser usado como ferramenta auxiliar na detecção de vacas adultas virêmicas em amostras coletivas, direcionando as análises dentro dos rebanhos. Por ser uma prova sensível permite procurar animais adultos PI, os mais raros de todos no rebanho (SMITH et al., 2008; HILL et al., 2009). Ao mesmo tempo, a detecção de novas amostras virais vai possibilitar mais estudos de epidemiologia molecular no País (CANAL et al., 1998, FLORES et al., 2002; CORTEZ et al., 2006; LUNARDI et al., 2008).

O terceiro artigo (Item 3.3) fez uma abordagem inicial da questão da transmissão do BVDV por *R. microplus*. Mosquitos, moscas e tabanídeos comprovadamente podem transmitir o vírus (TARRY et al., 1991; HOUE, 1999). Como estão presentes em regiões subtropicais, esse insetos e outros artrópodes, como o carrapato bovino (*R. microplus*) poderiam ter seu papel na transmissão de BVDV melhor investigados. Para isso, novamente, os parâmetros epidemiológicos da região deveriam ser melhor conhecidos como a densidade animal, a prevalência da diarreia viral bovina e a distribuição espacial da infecção. Todos esses fatores são importantes para o estabelecimento de estratégias de vigilância sanitárias e avaliação de risco geográfico de doenças (PATON et al., 1998; ZOCCAL et al., 2006; HORNBERG et al., 2008; ERSBØLL & ERSBØLL, 2009). O papel do carrapato na transmissão do BVDV é outro tema inédito da presente Tese. A detecção de genoma viral em teleóginas alimentadas em bovino PI é um resultado encorajador para futuras pesquisas, já que BVDV e carrapatos são prevalentes e importantes em criações de bovinos em áreas tropicais e subtropicais. Arbovírus podem ser transmitidos por carrapatos, talvez pelo fato de que o BVDV não pertença a esse grupo, até o momento ainda não foram realizados estudos para avaliar um eventual papel desse vetor na transmissão do vírus. Como carrapatos e BVDV coexistem e compartilham hospedeiro em quase todo o território nacional, parece importante e relevante esse tipo de investigação.

Outros assuntos que não foram abordados neste trabalho, mas poderiam receber mais atenção são:

A) Os efeitos causados pelo BVDV e pelo carrapato bovino (*R. microplus*) sobre a imunidade dos bovinos afetados.

B) O risco de transmissão do BVDV por premunicação de animais importados de regiões livres de carrapatos, uma prática usual no RS.

C) A investigação de outras espécies hospedeiras do BVDV como ovinos e bubalinos.

Vale ressaltar que o inquérito sorológico nacional do Uruguai identificou 100% de rebanhos de corte positivos para BVDV (GUARINO et al., 2008) e, adicionalmente, a região da fronteira é densamente povoada por bovinos e uma das principais produtoras de touros, vacas, novilhas e bezerros para outras regiões do RS. A movimentação dos bovinos dentro do Estado também pode ter implicações na prevalência da doença nas diferentes regiões. Quanto às outras espécies hospedeiras do BVDV, na região estudada no presente trabalho, há poucas ovelhas, entretanto, no RS existem mais de 4 milhões de ovinos (IBGE, 2009b) que compartilham pastagens com bovinos. O papel deste importante hospedeiro do BVDV e de outros pestivírus ainda é pouco estudado (VAN CAMPEN, 2009). No Brasil, há somente um relato de caso de distúrbios neurológicos em cordeiros, filhos de uma ovelha importada, compatível com doença da fronteira ou infecção por pestivírus (PESCADOR et al., 2004). Por outro lado, um inquérito em abatedouro, realizado na Argentina, identificou a infecção pelo agente em ovinos assintomáticos (JULIA et al., 2009). Na Áustria, Krametter-Froetscher et al. (2009) identificaram ovinos e caprinos assintomáticos infectados por pestivírus e também ressaltaram a importância desses hospedeiros na reintrodução do patógeno em rebanhos bovinos. Quanto aos búfalos (*Bubalus bubalis*), resultados sorológicos já comprovaram a exposição desses animais ao vírus (PITUCO et al., 1997). Eles representam uma outra importante espécie hospedeira de pestivírus que merece mais investigação. No Brasil existem 1,15 milhões de bubalinos e, no RS há pouco mais de 70 mil (IBGE, 2009b). A investigação de um surto de diarreia aguda, seguido do óbito de 7 búfalos criados no RS (Pantano Grande), iniciou com a identificação de achados patológicos compatíveis com infecção por BVDV e foi confirmado por imunofluorescência. Posteriormente o material genético foi amplificado, sequenciado e caracterizado como pestivírus atípico (STALDER et al., 2005; CANAL, C.W. comunicação pessoal). No país vizinho, Argentina, foi relatado outro caso de diarreia em búfalos associado com BVDV

genótipos 1a e 1b (CRAIG et al., 2008), comprovando a importância dos bubalinos como espécies hospedeiras do BVDV.

Por definição, diagnóstico refere-se à determinação da natureza da doença. A análise laboratorial deveria ser considerada apenas como um método auxiliar para a detecção do agente ou partes dele (antígenos ou genoma), ou a resposta imune induzida por ele. A construção do diagnóstico depende do histórico, anamnese e epidemiologia da doença. Assim, um bom histórico do quadro clínico presente no plantel, o conhecimento dos fatores predisponentes presentes na criação, a análise clínica, patológica, terapêutica e o diagnóstico diferencial com outras doenças semelhantes são fatores fundamentais para que se possa alcançar um diagnóstico específico.

Sobre a epidemiologia do BVDV, a doutoranda acredita que existe muito a ser investigado, uma vez que o Brasil é um país de dimensões continentais e apresenta diferenças socioculturais, econômicas e climáticas que constroem um caleidoscópio de cenários de produção animal (RODRIGUES & RODRIGUES, 2009). Por isso, parece fundamental que estudos epidemiológicos sejam realizados considerando as diferenças regionais presentes. Nos artigos desta Tese foram abordados alguns aspectos que podem dar início a investigações mais amplas sobre o papel do BVDV na pecuária leiteira do RS. A introdução de uma abordagem de amostragem coletiva em muito facilitou e futuramente poderá viabilizar estudos similares de forma rotineira. A doutoranda acredita que outro aspecto muito importante, no futuro, seja uma forma de divulgar adequadamente os resultados obtidos no experimento sobre a prevalência da infecção e conseguir, com isso, participar de forma efetiva no controle da enfermidade na cooperativa. Conforme as conclusões da presente Tese, as condições identificadas na população de bovinos estudada são propícias ao início de um programa de controle e erradicação do BVDV. Atualmente, o estudo inicial está sendo ampliado e os novos dados devem auxiliar nas estratégias futuras de controle da virose. Existe um bom grau de interação com o pessoal da cooperativa, o que permite visualizar uma inserção do conhecimento científico, gerado pela Universidade, de uma forma mais efetiva junto ao setor produtivo. Isto poderá também permitir uma troca de experiências entre o campo e a área de pesquisa, essencial para o planejamento de estudos realmente identificados com os problemas da bovinocultura.

Trabalhos de pesquisa, focando os diversos aspectos da infecção pelo BVDV são abundantes na literatura veterinária. A importância dada ao assunto representa o reconhecimento por parte da comunidade de pesquisadores em virologia e doenças de

bovinos, sobre a enorme relevância desse tema, principalmente pelo caráter de grande difusão da infecção na maioria dos países produtores de bovinos. Nos trabalhos que compõem esta Tese, foram apresentadas algumas informações e conclusões novas nesta área já bastante investigada. A doutoranda considera que algumas linhas de investigação foram abertas e merecem ser aprofundadas. Novos trabalhos já estão em andamento para continuar a buscar de novos desenvolvimentos e soluções nesta fascinante área de pesquisa.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Resumidamente pode-se concluir que:

A) O valor da prevalência estimada para a infecção pelo BVDV em uma população de gado de leite de proprietários associados a uma cooperativa no Estado do Rio Grande do Sul pela detecção de anticorpos por ELISA em amostras de tanque de leite foi de 26,7% (IC 95% entre 21,7 e 31,7%). O resultado foi considerado baixo em comparação com estimativas de prevalência de rebanhos realizadas por metodologias semelhantes em outras regiões de outros países;

B) A baixa prevalência para BVDV encontrada na pesquisa de anticorpos em tanque de leite foi positivamente relacionada ao número de animais dos rebanhos analisados, mas não pode ser relacionada a produção de leite, a densidade de bovinos (relação vacas/hectare), armazenamento de leite ou a origem do sêmen;

C) A baixa prevalência encontrada indica uma condição favorável para a realização de um programa de controle da infecção na população estudada;

D) Um protocolo de RT-PCR estabelecido através da modificação de metodologias previamente descritas na literatura foi considerado sensível e eficiente para detecção de RNA viral em amostras de leite. Estes resultados demonstraram uma sensibilidade analítica 100 ou 1000 vezes superior aos testes de RT-PCR convencionais descritos anteriormente para análises de leite. O teste apresentou uma sensibilidade equivalente aos testes de RT-PCR tempo real descritos para este tipo de amostra;

E) O teste de RT-PCR estabelecido detectou a presença BVDV em tanque de leite de dois rebanhos;

F) O teste RT-PCR estabelecido é uma alternativa rápida e sensível para identificação de rebanhos com infecção por BVDV em amostras coletivas e pode ser utilizado na monitoria de rebanhos de gado leiteiro;

G) Existe a possibilidade da infecção do carrapato bovino (*R. microplus*) por repasto sanguíneo em animais PI por BVDV. Isso confirma a importância do estudo de vetores hematófagos na epidemiologia de agentes virais de animais domésticos;

REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 14 jan. 2009.

ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V.; OLIVEIRA, S.A.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p.736-742, 2009.

BACHOFEN, C.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; STALDER, H.; PETERHANS, E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary Microbiology**, [10p.], 2009. No prelo. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/vetmic> Acesso em: 3 dez. 2009. DOI:10.1016/j.vetmic.2009.09.022.

BACHOFEN, C.; STALDER, H.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Veterinary Microbiology**, v.131, p.93–102, 2008.

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

BAXI, M.; MCRAE, D.; BAXI, S.; GREISER-WILKE, I.; VILCEK, S.; AMOAKO, K.; DEREGT, D. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.37-44, 2006.

BEAUDEAU, F.; BELLOC, C.; SEEGER, H.; ASSIE, S.; JOLY, A. Assessing the within herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. **Veterinary Record**, v.149, p.236–240, 2001.

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

BECHER, P.; AVALOS-RAMINEZ, R.; ORLICH, M.; CEDILLO ROSALES, S.; KONIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMEIER, H.; THIEL, H.J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implication for classification. **Virology**, v.311, p.96–104, 2003.

BERENDS, I.M.; SWART, W.A.; FRANKENA, K.; MUSKENS, J.; LAM, T.J.; VAN SCHAİK, G. The effect of becoming BVDV-free on fertility and udder health in Dutch dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.84, p.48-60, 2008.

BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.83, p.1-10, 2001.

BOCK, R.E; RODWELL, B.J.; MCGOWAN, M. Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in south-eastern Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.75, p.656-659, 1997.

BOLIN, S.R.; GROOMS, D.L. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.20, p.51-68, 2004.

BOTTON, S.A.; GIL, L.H.V.G.; SILVA, A.M.; FLORES, F.F.; WEIBLEN, R.; PITUCO, M.; ROEHE, P.M.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A.C. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, p.83-90, 1998.

BRACKENBURY, L.S.; CARR, B.V.; CHARLESTON, B. Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. **Veterinary Microbiology**, v.96, p.337-344, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 14 out. 2009.

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

BROCK, K.V.; GROOMS, D.L.; RIDPATH, J.; BOLIN, S.R. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p.22-26, 1998.

CANAL, C.W.; HOTZEL, I.; ALMEIDA, L.L.; ROEHE, P.M.; MASUDA, A. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). **Veterinary Microbiology**, v.48, p.373-379, 1996.

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

CHASE, C.C.L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A.A.A. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.20, p. 95–114, 2004.

CORAPI, W.V.; FRENCH, T.W.; DUBOVI, E.J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with non cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v.62, p.2823-2827, 1989.

CORNISH, T.E.; VAN OLPHEN, 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 ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.110-117, 2005.

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

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

CRAIG, M.I.; VENZANO, A.; KONIG, G.; MORRIS, W.E.; JIMÉNEZ, L.; JULIA, S.; CAPELLINO, F.; BLANCO VIERA, J.; WEBER, E.L. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Research in Veterinary Science**, v. 85, p.194–196, 2008.

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

DIEGUEZ, F.J.; YUS, E.; SANJUAN, M.L.; VILAR, M.J.; ARNAIZ, I. Monitoring bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection status in dairy herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.588-592, 2008.

DIEGUEZ, F.J.; YUS, E.; VILAR, M.J.; SANJUAN, M.L.; ARNAIZ, I. Effect of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection on dairy calf rearing. **Research in Veterinary Science**, v.87, p.39-40, 2009.

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

DRISKELL, E. A.; RIDPATH, J.F. A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.600–605, 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Genética Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite. Disponível em: <<http://www.cnpagl.embrapa.br/informativo.html>>. Acesso em: 2 set. 2009.

ERSBØLL, A.K.; ERSBØLL, B.K. Simulation of the K-function in the analysis of spatial clustering for non-randomly distributed locations—Exemplified by bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection in Denmark. **Preventive Veterinary Medicine**, v.91, p.64-71, 2009.

EVERMANN, J.F. Pestiviral infection of llamas and alpacas. **Small Ruminant Research**, v. 61, p.201-206, 2005.

FALCONE, E.; TOLLIS, M.; CONTI, G. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. **Vaccine**, v.18, p.387–388, 1999.

FERREIRA, L.C.L.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D.; MELO, O.; LEMOS R.A.A. Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.285-292, 2008.

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

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

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

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

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

FULTON, R.W.; SHAWN BLOOD, K.; PANCIERA, R.J.; PAYTON, M.E.; RIDPATH, J.R.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.T.; WELSH, R.D.; JOHNSON, B.J.; RECK, A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.464–477, 2009a.

FULTON, R.W.; WHITLEY, E.M.; JOHNSON, B.J.; RIDPATH, J.F.; KAPIL, S.; BURGE, L.J.; COOK, B.J.; CONFER, A.W. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. **The Canadian Journal Veterinary Research**, v.73, p.283-91, 2009b.

GIL, L.H.V.G.; ANSARI, I.H.; VASSILEV, V.; LIANG, D.; LAI, V.C.H.; ZHONG, W.; HONG, Z.; DUBOVI, E.J.; DONIS, R. O. The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus N^{PRO} protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. **Journal of Virology**, v.80, p.900–911, 2006.

GIVENS, M.D.; RIDDELL, K.P.; EDMONDSON, M.A.; WALZ, P.H.; GARD, J.A.; ZHANG, Y.J.; GALIK, P.K.; BRODERSEN, B.W.; CARSON, R.L.; STRINGFELLOW, D.A. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.42–51, 2009.

GONZÁLES, J.C. **O Controle do Carrapato do Boi**. Passo Fundo: Editora da Universidade Passo Fundo, Passo Fundo, 3 ed., 2003. 128p.

GRAHAM, D.A.; GERMAN, A.; MCLAREN, I.E.; FITZPATRICK, D.A. Testing of bulk tank milk from Northern Ireland dairy herds for viral RNA and antibody to bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Record**, v.149, p.261–265, 2001.

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R.D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, p.23-41, 2000.

GREISER-WILKE, I.; BLOME, S.; MOENNIG, V. Diagnostic methods for detection of classical swine fever virus: status quo and new developments. **Vaccine**, v.25, p.5524-5530, 2007.

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

GRIPSHOVER, E.M.; GIVENS M.D.; RIDPATH J.F.; BROCK, K.V.; WHITLEY, E.M.; SARTIN, E.A. Variation in E^{RNS} viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.11-21, 2007.

GROOMS, D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v.66, p.624-628, 2006.

GUARINO, H.; NUNEZ, A.; REPISO, M.V.; GIL, A.; DARGATZ, D.A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v.85, p.34-30, 2008.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Editora Plêiade/FAPESP, 2001. 218p.

HAINES, D.M.; CLARK, E.G.; DUBOVI, E.J. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Veterinary Pathology**, v.29, p.27-32, 1992.

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

HEFFERNAN, C.; MISTURELLI, F.; NIELSEN, L.; GUNN, G.J.; YU, J. Analysis of Pan-European attitudes to the eradication and control of bovine viral diarrhoea. **Veterinary Record**, v.164, p.163-167, 2009.

HILL, F.I.; REICHEL, M.P.; TISDALL, D.J. Use of molecular and milk production information for the cost-effective diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in New Zealand dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [3p.], 2009. No prelo. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/vetmic>>. Acesso em: 23 nov. 2009. DOI:10.1016/j.vetmic.2009.09.047

HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S.M.; MERTENS, P.; OURA, C.A.L.; VAN RIJN, P.A.; SLOMKA, M.J.; BANKS, J.; BROWN, I.H.; ALEXANDER, D.J.; KING, D.P. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.1-23, 2009.

HOFFMANN, B.; DEPNER, K.; SCHIRRMEIER, H.; BEER, M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.136, p.200-209, 2006.

HORNBERG, A.; FERNANDEZ, S.R.; VOGL, C.; VILCEK, S.; MATT, M.; FINK, M.; KÖFER, J.; SCHÖPF, K. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. **Veterinary Microbiology**, v.135, p.205-213, 2009.

HORZINEK, M.C. Pestivirus - taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, v.3, p.1-5, 1991.

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

HOUE, H. Serologic analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. **Research in Veterinary Science**, v.53, p.320-523, 1992.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.427-436, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006 Resultados preliminares**. Rio de Janeiro: IBGE, [146p.], 2006. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 dez. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Informações demográficas cidades, Brasil. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>>. Acesso em: 17 ago. 2009a.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA, pesquisa pecuária municipal. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 dez. 2009b.

JOLY, A.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU F. Description and first results of a BVDV control scheme in Brittany (western France). **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, p.209-213, 2005.

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

JULIA, S.; CRAIG, M.I.; JIMENEZ, L.S.; PINTO, G.B.; WEBER, E.L. First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v.90, p.274–277, 2009.

KAMPA, J.; STAHL, K.; MORENO-LOPEZ, J.; CHANLUN, A.; AIUMLAMAI, S.; ALENIUS, S. BVDV and BHV-1 infections in dairy herds in northern and northeastern Thailand. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 45, p.181–192, 2004.

KAMPA, J.; STAHL, K.; RENSTRÖM, L.H.M.; ALENIUS, S. Evaluation of a commercial E^{RNS}-capture ELISA for detection of BVDV in routine diagnostic cattle serum samples. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, [7p.], 2007. Disponível em: <<http://www.actavetscand.com/content/49/1/7>> Acesso em: 5 abr. 2008. DOI:10.1186/1751-0147-49-7.

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

KRAMETTER-FROETSCHER, R.; DUENSER, M.; PREYLER, B.; THEINER, A.; BENETKA, V.; MOESTL, K.; BAUMGARTNER, W. Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. **The Veterinary Journal**, [4p.], 2009. No prelo. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/tvjl>>. Acesso em: 19 jan. 2010.

LA ROCCA, S.A.; SANDVIK, T. A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle. **Journal of Virological Methods**, v.161, p.122-127, 2009.

LABUDA, M.; NUTTALL, P.A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, v.129, p.221–245, 2004.

LAUREYNS, J.; RIBBENS, S.; DE KRUIF, A. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. **The Veterinary Journal**, [6p.], 2009. No prelo. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/tvjl>>. Acesso em: 24 jul. 2009. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.11.014.

LETELLIER, C.; KERKHOFS, P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**, v.114, p.21-27, 2003.

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

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

LINDENBACH, B.D.; PRAGAI, B.M.; MONTSERRET, R.; BERAN, R.K.; PYLE, A.M.; PENIN, F.; RICE, C.M. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. **Journal of Virology**, v. 81, p.8905-8918, 2007.

LIU, L.; XIA, H.; BAULE, C; BELÁK, S; WAHLBERG, N. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of pestivirus phylogeny. **Virus Research**, v.147, p.47-52, 2010.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v.385, p.351-357, 2009.

LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; LISBOA, J.A.N.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research in Veterinary Science**, v.85, p.599-604, 2008.

MAINAR-JAIME, R.C.; BERZAL-HERRANZ, B.; ARIAS, P.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 52, p.63-73, 2001.

MARS, M.H.; VAN MAANEN, C. Diagnostic assays applied in BVDV control in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, p.43-48, 2005.

MARTINS, J. R. Carrapato bovino: epidemiologia e controle. **Caderno Boas Práticas Produção**, p.115-136, 2004.

MÄTZENER, P.; MAGKOURAS, I.; RÜMENAPF, T.; PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. The viral RNase E^{RNS} prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. **Virus Research**, v.140, p.15-23, 2008.

MCCLURKIN, A.W.; LITLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; FRANK, G.H.; CORIA, M.F.; BOLIN, S.R. Production of Cattle Immunotolerant to Bovine Viral Diarrhea Virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.48, p.156-161, 1984.

MCGOLDRICK, A.; BENSUADE, E.; IBATA, G.; SHARP, G.; PATON, D.J. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. **Journal of Virological Methods**, v.79, p.85-95, 1999.

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

MINAMI, F.; NAGAI, M.; ITO, M.; MATSUDA, T.; TAKAI, H.; JINKAWA, Y.; SHIMANO, T.; HAYASHI, M.; SEKI, Y.; SAKODA, Y.; SUGIURA, K.; AKASHI, H. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [5p.], 2009. No prelo. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/cimid>>. Acesso em: 7 dez. 2009. DOI:10.1016/j.cimid.2009.10.007.

MOENNIG, V.; HOUE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v.6, p.63-74, 2005.

MUNOZ-ZANZI, C.; JOHNSON, W.O.; THURMOND, M.; HIETALA, S. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p.195-203, 2000.

MUNOZ-ZANZI, C.; THURMOND, M.; HIETALA, S.; JOHNSON, W. Factors affecting sensitivity and specificity of pooled-sample testing for diagnosis of low prevalence infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, p.309-322, 2006.

NISKANEN R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. **Veterinary Record**, v.133, p.341-344, 1993.

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

NISKANEN, R.; ALENIUS, S.; LARSSON, B.; JACOBSSON, S.O. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. **Archives of Virology**, v.3, p.245-251, 1991.

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

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

ODEON, A.C.; RISATTI, G.; KAISER, G.G.; LEUNDA, M.R.; ODRIEZOLA, E.; CAMPERO, C.M.; DONIS R.O. Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p.133–144, 2003.

OLAFSON, P.; MACCALLUM, A.D.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinary**, v. 36, p.205-213, 1946.

OLIVEIRA E.A.S. **Caracterização Antigênica de amostras de vírus da diarreia viral bovina com anticorpos monoclonais**. 1996, 59p. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias - Faculdade de Veterinária, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

PATON, D.J.; CHRISTIANSEN, K.H.; ALENIUS, S.; CRANWELL, M.P.; PRITCHARD, G.C.; DREW, T.W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other virus in bulk tank milk in England and Wales. **Veterinary Record**, v.142, p.385-391, 1998.

PATON, D.J.; MCGOLDRICK, A.; BELÁK, S.; MITTELHOLZER, C.; KOENEN, F.; VANDERHALLEN, H.; BIAGETTI, M.; DE MIA, G.M.; STADEJEK, T.; HOFMANN, M.A.; THUER, B. Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. **Veterinary Microbiology**, v. 73, p.159-74, 2000.

PEREIRA, M. C. Taxonomia do subgênero *Boophilus* e suas espécies. In: _____ PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. J. P.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – Biologia, controle e resistência**. São Paulo: MedVet Livros, 2009. p.7-12.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: _____ PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. J. P.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – Biologia, controle e resistência**. São Paulo: MedVet Livros, 2009. p.15-56.

PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, F.G.; DRIEMEIER, D.; GONÇALVES, R.K.; CRUZ, C.E.F. Distúrbio neurológico em ovino associado com infecção por pestivírus no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.935-938, 2004.

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

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [8p.], 2009. No prelo. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/vetmic>>. Acesso em: 3 dez. 2009. DOI:10.1016/j.vetmic.2009.09.038.

PILZ, D.; ALFIERI, A.F.; LUNARDI, 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1-7, 2007.

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

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

PRITCHARD, G.D. Making the best use of bulk milk antibody tests. **Cattle Practice**, v.6, p.133-137, 1998.

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

RECK JUNIOR. **Farmacologia da saliva do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: papel da modulação da hemostasia na relação parasito-hospedeiro**. 2009, 105p. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RICHTZENHAIN, L.J.; BARBARINI, J.R.; UMEHARA, O.; DE GRACIA, A.S.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA, F.; SOARES, R.M. Diarreia viral bovina: levantamento sorológico nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. **Arquivos Instituto Biológico: [São Paulo]**, v.66, p.107-111, 1999.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v.205, p.66–74, 1994.

RIKULA, U.; NUOTIO, L.; LAAMANEN, U.I.; SIHVONEN, L. Transmission of bovine viral diarrhoea virus through the semen of acutely infected bulls under field conditions. **Veterinary Record**, v.162, p.79-82, 2008.

ROBERT, A.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H.; JOLY, A.; PHILIPOT, J.M. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). **Theriogenology**, v.61, p.117-127, 2004.

RODRIGUES, J.L.; RODRIGUES, B.A. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil seu papel no melhoramento genético. **Revista Ceres**, v. 56, p.428-439, 2009.

ROSSMANITH, W.; JANACEK, R.; WILHELM, E. Control of BVDV-infection on common grassland—The key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, p.133-137, 2005.

RUGGLI, N.; BIRD, B.H.; LIU, L.; BAUHOFER, O; TRATSCHIN, J.D; HOFMANN, M.A. N^{PRO} of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alfa/beta induction. **Virology**, v.340, p.265-276, 2005.

SALIKI, J.T.; DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.20, p.69-83, 2004.

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

SANG, R.; ONYANGO, C.; GACHOYA, J.; MABINDA, E.; KONONGOI, S.; OFULA, V.; DUNSTER, L.; OKOTH, F.; COLDREN, R.; TESH, R.; ROSA, A.T.; FINKBEINER, S.; WANG, D.; CRABTREE, M.; MILLER B. Tickborne arbovirus surveillance in market livestock, Nairobi, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1074-1080, 2006.

SCHERER, C.F.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KREUTZ, L.C.; DÜRR, J.W.; BRUM, L.P.; QUADROS, V.L.; LIMA, M. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.45-50, 2002.

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

SCHWEIZER, M.; MÄTZENER, P.; PFAFFEN, G.; STALDER, H.; PETERHANS, E. "Self" and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. **Journal of Virology**, v.80, p.6926-6935, 2006.

SMITH, R.L.; SANDERSON, M.W.; WALZ, P.H.; GIVENS, M.D. Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhoea virus in auction market cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.75–78, 2008.

STAHL, K.; LINDBERG, A.; RIVERA, H.; ORTIZ, C.; MORENO-LÓPEZ, J. Self-clearance from BVDV infections- A frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v.83, p.285–296, 2008.

STAHL, K.; BEER, M.; SCHIRRMEIER, H.; HOFFMANN, B.; BELÁK, S.; ALENIUS, S. Atypical 'HoBi'-like pestiviruses-Recent findings and implications thereof. **Veterinary Microbiology**, [4p.], 2009. No prelo. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/vetmic>>. Acesso em: 25 out. 2009. DOI:10.1016/j.vetmic.2009.09.048.

STAHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON-WADMAN, A.; BAULE, C.; AIUMLAMAI, S.; BELÁK, S. Natural infection of cattle with an atypical "HoBi"-like pestivirus – Implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v.38, p.517–523, 2007.

STALDER H.P.; MEIER, P.H.; PFAFFEN, G.; CANAL, C.W.; RUFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFFEN, C.; MARTI, S.; VOGT H.R.; PETERHANS, E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, p.354-358, 2005.

TARRY, D.W.; BERNAL L.; EDWARDS, S. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. **Veterinary Record**, v.128, p.82-84, 1991.

TAUTZ, N.; MEYERS, G.; THIEL, H.J. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. **Clinical and Diagnostic Virology**, v.10, p.121–127, 1998.

THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNIG, V. Pestiviruses. In: _____FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.) **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven Co., 1996. p.1059–1074.

THOBOKWE, G.; HEUER, C.; HAYNES, D.P. Validation of bulk tank milk antibody ELISA to detect dairy herds likely infected with bovine viral diarrhoea virus in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.52, p.394-300, 2004.

THOMPSON, J.A.; LEITE, R.M.H.; GONÇALVES, V.S.P.; LEITE, R.C.; BANDEIRA, D.A.; HERRMANN, G.P.; MOREIRA, E.C.; PRADO, P.E.F.; LOBATO, Z.I.P.; BRITO, C.P.T.; LAGE, A.P. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.76, p.290–301, 2006.

UTTENTHAL, A.; STORGAARD, T; OLEKSIEWICZ, MB; DE STRICKER, K Experimental infection with the Paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs: determination of viral replication kinetics by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.197–212, 2003.

VAN CAMPEN, H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [5p.], 2009. No prelo. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/vetmic>>. Acesso em: 24 out. 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.09.049.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; MAHY, B.W.J. Emerging Issues in Virus Taxonomy. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.8-13, 2004.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v.5, p.51-58, 1974.

VIET, A.F.; FOURICHON, C.; SEEGER, H. Review and critical discussion of assumptions and modeling options to study the spread of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) within a cattle herd. **Epidemiology and Infection**, v.135, p.706–721, 2007.

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

VILCEK, S.; HERRING, A.J; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P.; PATON, D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.136, p.309–323, 1994.

VILCEK, S.; NETTLETON, P. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.1-12, 2006.

VILCEK, S.; PATON, D.J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEJA, S.; SCICLUNA, M.T.; PALFI, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v.46, p.99-115, 2001.

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

WIKIPÉDIA. Mapa das mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%B5es_do_Rio_Grande_do_Sul>. Acesso em: 30 dez. 2009.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology**, v.65, p.247–274, 2006.

YESILBAG, K.; FÖRSTER, C.; BANK-WOLF, B.; YILMAZ, Z.; ALKAN, F.; OZKUL, A.; BURGU, I.; ROSALES, S.C.; THIEL H.-J.; KÖNIG, M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. **Veterinary Microbiology**, v.130, p.258-267, 2008.

YOUNG, N.J.; THOMAS, C.J.; COLLINS, M.E.; BROWNLIE, J. Real-time RT-PCR detection of Bovine Viral Diarrhoea virus in whole blood using an external RNA reference. **Journal of Virological Methods**, v.138, p.218-222, 2006.

ZOCCAL, R.; ASSIS, A.G.; EVANGELISTA, S.R.M. Distribuição geográfica da pecuária leiteira no Brasil. **EMBRAPA Gado de Leite**, Juiz de Fora, [8p.], 2006. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/publicacoes/circular/CT88.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2009.

ANEXO 1

Questionário epidemiológico para rebanhos de gado de leite da COSUEL

Data da aplicação: ___/___/___ Entrevistador: _____

Nome do proprietário: _____ Pontos de GPS: _____

Nº de Matrícula: _____ Tel.:() _____

Nome do respondente: _____ É proprietário? ()sim ()não

Data de nascimento: ___/___/___

Estudou quantos anos? ()

1. nenhum;

4. 8 a 11 anos;

Escolaridade?

2. 1 a 3 anos

5. > 11 anos

3. 4 a 7 anos

6. não lembra

| |
|--|
| Nº. Questões |
| 1 Propriedade possui funcionário contratado? ()sim ()não |
| 2 Número de bovinos totais da propriedade? |
| 3 Compra animais de reposição? ()sim ()não (caso não, pule para Q.6) |
| 4 Quando foi a última compra de animais/novilha? () < 1 ano () > 1 ano () não lembra (caso não lembre, pule para Q.6) Opcional. Lembra o ano da compra? _____ |
| 5 Sobre a origem dos animais comprados: De outro associado: ()sim ()não De outros produtores não associados: ()sim ()não De outro Estado: ()sim ()não De outro país: ()sim ()não |
| 6 Você observou no último ano (2009) |
| 6.1 Nascimento de terneiros fracos? ()sim ()não ()não lembra |
| 6.2 Aborto (s)? ()sim ()não ()não lembra |

| | |
|-----------|---|
| | 6.3 Aumento de taxa de retorno ao cio? ()sim ()não ()não lembra |
| | 6.4 Realizou tratamento para retenção de placenta? ()sim ()não ()não lembra |
| | 6.5 Realizou tratamento para problemas respiratórios? ()sim ()não ()não lembra |
| | 6.6 Realizou tratamento para diarreias? ()sim ()não ()não lembra |
| 7 | Utiliza quantas doses de sêmen por fêmea aproximadamente? ()1-2 ()3-4 ()>4 |
| 8 | Fez repasse com monta natural no último ano? ()sim ()não |
| | 8.1 Caso sim, utilizou touro próprio? ()sim ()não |
| 9 | Seus animais tem contato com os animais dos vizinhos? ()sim () não ()não sabe |
| 10 | Utiliza pastagem em comum com animais de outras propriedades? ()sim ()não |
| 11 | Qual dos seguintes animais você possui: |
| | 11.1 Suínos? () sim () não |
| | 11.2 Aves? () sim () não |
| | 11.3 Ovinos? () sim () não |
| | 11.4 Cabras? () sim () não |
| 12 | Possui cão na propriedade? () sim ou () não , caso sim, antes? _____ |
| 13 | Qual é a origem da água fornecida aos animais? |
| | 13.1 Rede pública () sim () não |
| | 13.2 Poço artesiano () sim () não |
| | 13.3 Cursos naturais () sim () não |
| 14 | A ração (concentrado) é: |
| | 14.1 Produzido na propriedade () sim () não |
| | 14.2 Industrializada () sim () não |

15 Tipo de restrição à entrada de pessoas estranhas na propriedade (avaliação do revistador):

15.1 Placa de aviso () sim () não

15.2 Porteira () sim () não

15.3 Corrente () sim () não

15.4 Outro:

16 Características da sala de ordenha (avaliação do entrevistador)

16.1 Piso () sim () não

16.2 Parede com azulejo () sim () não

16.3 Organização e limpeza () 1- Bom 2- Médio 3 -Ruim

Espaço para observações: