

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
Ciências Veterinárias

SEROPREVALÊNCIA DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD) EM EXPLORAÇÕES DE BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO ALENTEJO

RODRIGO MIGUEL DIAS CANÁRIO

Orientador: Dr. José Costa Mira

Co-orientador: Professor Doutor João Simões



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Vila Real, 2009

Resumo

O vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) tem distribuição mundial e é responsável por perdas económicas, produtivas e reprodutivas, na indústria pecuária bovina. É um RNA vírus, da família *Flaviridae* e género *Pestivirus*. Tem dois génotipos, o BVDV-1 e o BVDV-2, divididos em vários subgrupos, e apresenta dois biótipos, o citopatogénico e o não-citopatogénico. Foi, inicialmente, na década de 40, associado a distúrbios gastroentéricos, mas actualmente está mais relacionado com processos reprodutivos. A infecção pelo BVDV tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações, desde infecções subclínicas até formas mais graves com destaque para a Doença das Mucosas, com mortalidade elevada. A infecção de fêmeas gestantes seronegativas pode provocar múltiplos defeitos congénitos nos fetos ou o nascimento de vitelos persistentemente infectados (PI). O BVDV está relacionado com a Síndrome Respiratória Bovina como agente patogénico primário ou agente imunossupressor. Contudo, ainda é desconhecido o impacto provocado pelo BVDV em muitas regiões e explorações de Portugal.

O objectivo do presente trabalho foi determinar a seroprevalência do BVDV em 20 explorações de bovinos de carne em regime de exploração extensiva, sem programa vacinal contra a doença, distribuídas pela região do Alentejo, através da pesquisa de anticorpos anti-BVDV. O estudo foi efectuado através da recolha de amostras sanguíneas numa percentagem dos bovinos com mais de 1 ano de idade presentes nas 20 vacadas, calculada através da fórmula publicada por Toma *et al.* (2004) e partindo do pressuposto de haver infecção de 50% dos animais em cada exploração, com posterior exame serológico pelo método ELISA de competição. Foram detectadas 39 amostras positivas num universo de 111 animais analisados, correspondendo a uma seroprevalência de 35,1%. A seropositividade estava presente em 12 das 20 explorações analisadas (65%). Foi observado um efeito da Exploração ($p < 0,001$) com uma amplitude de seroprevalência entre 0 e 100%. Metade das explorações seropositivas possuía frequência de anticorpos anti-BVDV superior a 75%, às quais se atribui a existência de pelo menos um animal PI e conseqüente infecção activa da vacada. O reforço das medidas de biossegurança e instauração de programas específicos de prevenção e controlo da doença devem ser considerados em todas as explorações analisadas. No entanto, considerando que as actuais dinâmicas epidemiológicas da região não sofram alterações significativas, os resultados sugerem que o recurso à vacinação apenas seja necessário nas explorações seropositivas, com eliminação dos animais PI. São necessários mais estudos alargados à região em causa, de forma a elaborar um mapa epidemiológico e estabelecer o real impacto da doença na economia regional e nacional.

Abstract

Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV) is widespread all over the world and it's responsible for economic, productive and reproductive, losses in the cattle production industry. It is a RNA virus, of the family *Flaviridae* and genus *Pestivirus*. Two genotypes, BVDV-1 and BVDV-2, are divided in several subgroups with cytopathic and non-cytopathic biotypes. Initially, in 1940s, the BVDV was associated with gastroenteric disorders, but actually it's more related with reproductive processes. The infection has been associated with several manifestations, from subclinical infections to severe forms, with emphasis for the high mortality due to Mucosal Disease. The infection of pregnant and seronegative cows could result in multiple congenital defects in fetuses or the birth of persistent infected (PI) calves. The BVDV is related with Bovine Respiratory Syndrome as primary pathogenic agent or like an immunosuppressor agent. The BVDV impact in several regions and herds of Portugal remain unknown.

The aim of the present work was to determine the seroprevalence of BVDV, with determination of levels of antibodies, in 20 beef herds in extensive grazing without vaccinal program, distributed in the Alentejo region. The study was made through the collect of blood samples from cows aged more than one year present in all exploitations, based in the formula published by Toma *et al.* (2004) and accepting an infection of 50% on each herd, making posterior serological examination by the competitive ELISA method. It was detected 39 positive samples in an universe of 111 cows, corresponding to a global seroprevalence of 35.1%. Seropositivity was present at 12 of the 20 herds analyzed (65%). A Herd effect ($p < 0,001$) was observed with a seroprevalence ranging 0 to 100%. Half of affected herds had anti-BVDV antibodies frequency greater than 75%, which attribute the existence of, at least, one PI animal and the consequent active infection in the herd. Biosecurity measures strengthening and prevention and control specific programmes efforts should be considered in all analyzed herds. However, considering the non-occurrence of significant regional epidemiologic dynamics changes, the results suggest that the vaccination is only necessary in seropositive herds, with the removal of PI animals. There are necessary more studies in this region, in order to prepare an epidemiological map and establish the real impact of this disease in regional and national economy.

*“As doutrinas apresentadas no presente trabalho
são da exclusiva responsabilidade do autor.”*

Índice Geral

I. A DIARREIA VIRAL BOVINA	1
1. Introdução	1
2. A resenha histórica da Diarreia Viral Bovina	2
3. Classificação e caracterização do agente etiológico	4
4. Epidemiologia	9
4.1. Prevalência	9
4.2. Transmissão	10
4.2.1. Transmissão horizontal	10
4.2.2. Transmissão vertical	12
4.2.3. Transmissão dentro da exploração	12
4.2.4. Transmissão entre explorações	12
4.3. Importância económica	13
5. Patogenia e Quadro Clínico	15
5.1. Infecção aguda pós-natal em animal imunocompetente e não gestante	15
5.1.1. Infecção subclínica	15
5.1.2. Infecção clínica aguda	16
5.1.3. Infecção clínica hiperaguda	17
5.1.4. Síndrome hemorrágica e Trombocitopenia	18
5.2. Infecção intra-uterina (congénita)	18
5.2.1. Infecção anterior à inseminação	19
5.2.2. Infecção venérea	19
5.2.3. Infecção durante o período embrionário (0-45 dias de gestação)	20
5.2.4. Infecção após o período embrionário entre 45-125 dias de gestação	20
5.2.5. Infecção durante o período fetal entre 125 e 175 dias de gestação: Defeitos congénitos	21
5.2.6. Infecção no último terço de gestação (entre os 180 dias e o final da gestação)	22
5.3. Animais Persistentemente Infectados	22
5.4. Doença das Mucosas	24

5.4.1. Doença das Mucosas: forma aguda	25
5.4.2. Doença das Mucosas: forma crónica	26
5.5. Imunossupressão	27
5.5.1. Patologia Respiratória	28
6. Diagnóstico	28
6.1. Isolamento do vírus	29
6.2. Detecção antigénica	30
6.2.1. Detecção dos ácidos nucleicos	31
6.2.2. <i>Polimerase Chain Reaction</i>	31
6.3. Avaliação serológica	32
6.4. Aplicação das técnicas laboratoriais na exploração	33
6.4.1. Infecções agudas	33
6.4.2. Infecções persistentes	34
6.4.3. Doença das Mucosas	34
7. Diagnóstico diferencial	35
8. Prognóstico e Tratamento	35
9. Profilaxia e Controlo	36
9.1. Vacinas	38
9.1.1. Vacinas vivas modificadas	39
9.1.2. Vacinas inactivadas	40
9.1.3. O futuro: vacinas marcadas	41
9.2. Programas de controlo para limitar as perdas devidas ao BVDV	41
9.2.1. Bovinos leiteiros	42
9.2.2. Bovinos de carne	43
9.2.3. Bovinos em sistema <i>feedlot</i>	44
II. ESTUDO DA SEROPREVALÊNCIA DE BVDV EM EXPLORAÇÕES DE BOVINOS DE CARNE NO ALENTEJO	46
1. Introdução	46
2. Material e métodos	47

2.1. Animais, natureza das explorações e amostras	47
2.2. Ensaio das análises	49
2.3. Análise estatística	50
3. Resultados	50
4. Discussão	53
5. Considerações finais	58
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Índice de Figuras

Figura 1 - Organização do genoma do vírus da Diarreia Viral Bovina	6
Figura 2 - Efeito do estágio de gestação no momento da infecção de fêmeas gestantes susceptíveis	22
Figura 3 - Localização das explorações analisadas	48

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Proteínas virais que compõem o vírus da BVD	7
Tabela 2 - Seroprevalência de anticorpos contra o BVDV em todas as explorações testadas	51
Tabela 3 - Seroprevalência de anticorpos contra o BVDV em cada exploração avaliada	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Frequência de anticorpos contra o BVDV na totalidade das explorações estudadas	51
Gráfico 2 - Frequência de anticorpos contra o BVDV (amostras positivas) observada em cada exploração	52

Lista de abreviaturas e siglas

- BDV** – Vírus da *Border Disease* (*Border Disease Virus*)
- BVD** – Diarreia Viral Bovina (*Bovine Viral Diarrhea*)
- BVDV** – Vírus da Diarreia Viral Bovina (*Bovine Viral Diarrhea Virus*)
- BVDV-1** – Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 1
- BVDV-2** – Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2
- BHV-1** – Herpesvírus Bovino tipo 1 (*Bovine Herpesvirus type 1*)
- BRSV** – Vírus Respiratório Sincicial Bovino (*Bovine Respiratory Syncytial Virus*)
- CP** – Citopatogénico
- CSFV** – Vírus da Peste Suína Clássica (*Classical Swine Fever Virus*)
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- DRB** – Doença Respiratória Bovina
- ELISA** – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- IBR** – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*)
- IHC** – Imunohistoquímica
- MD** – Doença das Mucosas (*Mucosal Disease*)
- NCP** – Não-citopatogénico
- PCR** – Reacção em Cadeira da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
- PI** – Permanentemente infectado
- PI-3** – Parainfluenza-3
- RT-PCR** – *Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*
- SN** – Seroneutralização
- UTR** – Região não traduzida (*Untranslated Region*)

Agradecimentos

Ao Professor Dr. João Simões, pelo apoio e interesse desde logo manifestados, pelos ensinamentos e orientação. Por ter demonstrado que com muito trabalho, empenho e dedicação se conseguem fazer bons trabalhos científicos.

Ao Dr. José Mira, um agradecimento especial pela orientação, conhecimento transmitido, amizade e exemplo profissional (“o Mestre e os seus discípulos”).

Ao Dr. Miguel Matos e aos laboratórios Pfizer, grandes mecenas deste projecto, pelo contributo e enorme disponibilidade prestados.

À Dr.^a Maria Helena Monteiro pela simpatia, ajuda e profissionalismo.

Ao Eng. Godinho e ao Rui dos Coelhos pela partilha de saberes e auxílio fundamental ao longo do estágio e fora dele... Foi muito bom poder fazer parte do vosso grupo de trabalho.

À minha colega de estágio, Rita, pela convivência, ajuda e alegria.

À Belinha, Vera, João e Inês, amigos que, apesar da distância, estiveram sempre presentes (grande família JOSÉ!).

Ao Nelson e à Patrícia pela amizade e incentivo que me deram.

À Ana, Sara e “Caloirinha” pelos momentos inesquecíveis e grande amizade demonstrada.

À Marta, Márcia e Di, amigas e companheiras de noites longas e dias curtos...

A todos os colegas de curso que me acompanharam ao longo destes anos em Vila Real.

A todos os que pertenciam ao “Clube Casa do Krilin” por me terem acolhido numa cidade que outrora desconhecia, pelos bons momentos passados, companheirismo e amizade.

A toda a minha família que sempre me apoiou ao longo desta etapa.

Ao meu irmão, que sempre se manteve ao meu lado, ajudou e aconselhou sempre que necessário.

Aos meus pais pelo amor e carinho incondicional, incentivo e transmissão de valores, pilares essenciais para aquilo que sou hoje.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação enquanto pessoa e profissional.

A todos, MUITO OBRIGADO!

“Os dias prósperos não vêm ao acaso; são granjeados, como as searas, com muita fadiga e com muitos intervalos de desalento.”
(Camilo Castelo Branco)

I. A Diarreia Viral Bovina

1. Introdução

O vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) tem distribuição mundial e é responsável por perdas económicas, produtivas e reprodutivas, na indústria pecuária bovina.

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

Os animais PI são o reservatório primário do BVDV, sendo por isso considerados como a maior fonte de infecção nas explorações. Estes animais são imotolerantes ao vírus, o seu sistema imunitário não responde ao BVDV, então o vírus continua a multiplicar-se, infecta tecidos do animal, sendo excretado ao longo da vida do animal.

O BVDV está relacionado com a Síndrome Respiratório Bovino, como agente patogénico primário ou agente imunossupressor, podendo agir como potenciador de infecções secundárias.

Com o aumento dos conhecimentos na biologia, patogenia e epidemiologia do BVDV, foi possível desenvolver técnicas de diagnóstico capazes de o detectar, nomeadamente as técnicas de PCR, imunohistoquímica e ELISA, bem como através da pesquisa de anticorpos em amostras de leite provenientes do tanque de recolha.

O vírus pode persistir nas explorações pela aquisição de animais PI ou gestantes de fetos PI, embora possa existir risco de infecção na presença de uma fonte de infecção em rebanhos vizinhos ou através de transmissão por contacto indirecto. O BVDV ainda pode ser transmitido através de sêmen, embriões ou produtos biológicos contaminados.

Não há nenhum tratamento eficaz para a infecção por BVDV, mas alguns casos são subclínicos e autolimitantes.

A prevenção e controlo da doença é a forma mais eficaz de erradicar e impedir a reinfeção na exploração. Os programas de controlo englobam medidas de biossegurança e de vigilância estritas, com identificação e eliminação de animais PI e, em alguns casos, efectua-se adicionalmente a vacinação do efectivo contra o agente, com vacinas vivas modificadas ou vacinas inactivadas, fornecendo algum grau de imunidade aos animais. Actualmente, estão a ser

desenvolvidos esforços adicionais para aumentar a protecção fetal através da vacinação nas situações em que se torne necessário.

2. A resenha histórica da Diarreia Viral Bovina

Em 1946, nos Estados Unidos da América (EUA), investigadores da Universidade de Cornell descreveram uma nova doença transmissível entre bovinos. Olafson *et al.* (1946) caracterizaram esta doença por leucopenia, febre alta, depressão, diarreia e desidratação, anorexia, salivação, descargas nasais, erosões gastrointestinais e hemorragias em vários tecidos. Esta afecção tinha sido inicialmente observada em Ithaca (Nova Iorque) pelo Dr. Francis Fox, que na primeira abordagem considerou estar perante uma clássica disenteria de Inverno (Fox, 1996 citado por Deregt, 2005).

Posteriormente, novos surtos da doença ocorreram noutros rebanhos da área. Em cinco rebanhos atingidos inicialmente, a morbilidade variou entre 33-88% e a mortalidade entre 4-8%. Outros sinais clínicos foram, também, observados: a produção de leite diminuiu, ocorreram abortos entre 10 dias a 3 meses após a infecção, bem como algumas das vacas de um dos rebanhos desenvolveram pneumonia (Deregt, 2005). Não foi encontrada nenhuma bactéria no sangue ou tecidos que produzisse os mesmos sinais clínicos em animais saudáveis (BVDV: Control & Prevention, 2005). Considerou-se, no entanto, a leucopenia grave observada nos animais afectados clinicamente como indicadora de etiologia viral (Deregt, 2005). Foi, assim, denominada como Diarreia Viral Bovina ou em inglês *Bovine Viral Diarrhea* (BVD) (Grooms *et al.*, 2006b).

As lesões da BVD assemelhavam-se às da peste bovina, uma doença considerada exótica nos EUA. Contudo, a doença observada por Olafson e colaboradores não se comportou como a peste bovina. A peste bovina apresentava um quadro clínico mais devastador com alta taxa de transmissão e mortalidade, comparativamente à BVD (Deregt, 2005).

Após o relato da forma aguda em Nova Iorque, Childs (1946) descreveu uma doença idêntica mas mais grave no gado bovino, no Canadá (Childs, 1946 citado por Deregt, 2005). Este relato foi considerado por Pritchard (1963), na sua revisão, como a primeira descrição da Doença das Mucosas (MD) (Pritchard, 1963 citado por Deregt, 2005). Anteriormente, em 1953, Ramsey e Chivers (1953) relataram a MD nos EUA, dando este nome à doença (Ramsey e Chivers, 1953 citado por Deregt, 2005). Tal como Olafson, estes investigadores observaram lesões ulcerativas nas mucosas e diarreia (BVDV: Control & Prevention, 2005) com fezes aquosas, por vezes sanguinolentas (Deregt, 2005). As lesões do tracto gastrointestinal verificadas na MD eram

muito mais graves que aquelas observadas na BVD. Para além disso, a MD afectou apenas alguns animais do rebanho, mas teve índices mais elevados de casos fatais (Deregt, 2005). Ter-se-á pensado que se tratava de uma entidade causadora da doença diferente daquela que causava a BVD, mas, mais uma vez, não foi encontrado nenhum agente bacteriano associado à doença (BVDV: Control & Prevention, 2005). Estudos efectuados no início da década de 1960 por Gillespie, Kniazeff, Thomson, Savan e seus colaboradores, utilizando neutralização viral, determinaram que os agentes virais isolados da BVD e da MD na América do Norte e na Europa eram os mesmos e que as diferentes manifestações clínicas das doenças eram causadas pelo mesmo agente (Gillespie *et al.*, 1961, Kniazeff *et al.*, 1961, Thomson e Savan, 1963 citados por Deregt, 2005). O agente foi denominado por Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) (Andrews *et al.*, 2004).

Com o isolamento de uma amostra, em 1960, que produziu efeito citopatogénico em histoculturas (amostra Oregon C24V), ensaio realizado por Gillespie e colaboradores, e que serviu de referência internacional, muito progresso foi feito no estudo do BVDV (Gondim, 2006). A descoberta de estirpes citopatogénicas permitiu o desenvolvimento da seroneutralização e de ensaios em placa de neutralização. Assim, a seroneutralização tornou-se um importante exame de diagnóstico, sendo ainda amplamente utilizado (Deregt, 2005).

Ainda nos anos 60 do século passado, ficou estabelecido que o BVDV estava antigenicamente relacionado com o vírus da peste suína clássica (CSFV – *Classical Swine Fever Virus*). Mais tarde, evidências serológicas indicaram que o agente causador da *Border disease* (BDV) em ovinos também estava relacionado com o BVDV e CSFV (Deregt, 2005).

Nos anos 70, ficou estabelecido que animais com infecções congénitas com o BVDV eram economicamente desvantajosos e, geralmente, morreriam em poucos meses, mas quando sobreviviam ficavam persistentemente infectados com o vírus e possuíam quantidades deficitárias de anticorpos seroneutralizantes contra o BVDV. As lesões microscópicas dos animais PI foram primeiramente observadas no cérebro e rins, por Cutlip *et al.* (1980) citado por Deregt (2005).

Em 1987 foi feito o primeiro relato de infecção por BVDV associada com trombocitopenia e hemorragias, em explorações leiteiras no nordeste dos EUA (Deregt e Loewen, 1995; Deregt, 2005). Já nos finais dos anos 80 ocorreram avanços significativos na biologia molecular do BVDV, com a primeira sequenciação genómica das estirpes de BVDV, a descoberta da proteína marcadora para o vírus citopatogénico e a primeira evidência do RNA recombinante nas estirpes citopatogénicas dos vírus da Diarreia Viral Bovina (Deregt, 2005).

Em 1994, Pellerin e os seus colaboradores afirmaram que as estirpes de BVDV isoladas da síndrome hemorrágica e da forma aguda grave da Diarreia Viral Bovina formam um novo grupo genético (genótipo) do BVDV, distinto das estirpes mais antigas que se utilizavam nas vacinas de então. O novo grupo foi designado tipo 2 (BVDV-2) e o grupo comparado de estirpes antigas como tipo 1 (BVDV-1) (Deregt, 2005). No mesmo ano, Pellerin *et al.* (1994) subdividiram o BVDV-1 em dois subgrupos: 1a e 1b (citado por Deregt, 2005).

Em 2001, a Organização Internacional de Epizootias (OIE) adicionou a BVD à sua lista de doenças, tanto devido à sua propagação a nível internacional, como à sua importância para o comércio de animais. É, assim, um forte sinal que a BVD está a tornar-se uma prioridade internacional (Lindberg *et al.*, 2006).

Em 2002, foi criado um projecto financiado pela União Europeia que pretendia relacionar e partilhar as experiências no controlo da BVD na Europa. Esta rede temática, brevemente apresentada em <http://www.bvdv-control.org/>, juntou médicos veterinários especialistas de 17 países europeus, cujos objectivos específicos incluíam a avaliação das abordagens diagnósticas, comparação de dados epidemiológicos, uso de medidas imunoproláticas, bem como o estudo de factores socioeconómicos associados ao controlo da BVD (Sandvik, 2004). A rede esteve activa ao longo de três anos, concluindo o seu trabalho no Outono de 2005 (Lindberg *et al.*, 2006).

Actualmente, o vírus da Diarreia Viral Bovina tem distribuição mundial (Houe, 1999; Flores, 2003; Sandvik, 2004; Flores *et al.*, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007) e causa perdas económicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo, devido a perdas produtivas e reprodutivas (Greiser-Wilke *et al.*, 2003; Houe, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Brock *et al.*, 2005; BVDV: Control & Prevention, 2005; Passler *et al.*, 2007), tais como menores ganhos de peso, perda na produção leiteira, baixos índices reprodutivos e morte (Gunn *et al.*, 2004; Grooms *et al.*, 2006b; Smith *et al.*, 2009). Nas últimas duas décadas, os avanços das pesquisas em genética molecular conduziram ao aumento da compreensão da vasta gama de doenças clínicas associadas à BVD (BVDV: Control & Prevention, 2005).

3. Classificação e caracterização do agente etiológico

O vírus da Diarreia Viral Bovina pertence à família *Flaviridae*, género *Pestivirus*, que abriga outros dois vírus antigenicamente relacionados: o vírus da Peste Suína Clássica e o vírus da *Border disease*, de ovinos (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Flores *et al.*, 2005; Ridpath, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008). O genoma do BVDV é caracterizado por moléculas de RNA linear (RNA vírus), cadeia

simples, polaridade positiva, de aproximadamente 12,3 quilo pares de bases (kpb) de comprimento (Flores *et al.*, 2005, Ridpath, 2005; Vilček e Nettleton, 2006). A organização deste genoma, que é conservado dentro da família dos flavivírus, consiste numa longa *open reading frame* (ORF), com cerca de 4000 codões, contornada pelas regiões não traduzidas 5'UTR (360-390 bases) e 3'UTR (200-240 bases) (Ridpath, 2005; Vilček e Nettleton, 2006). A ORF é traduzida numa única poliproteína, que é clivada pelas proteases virais e celulares, dando origem entre 10 a 12 polipéptidos estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais estão codificadas na extremidade 5' do genoma, enquanto as proteínas não estruturais encontram-se codificadas na extremidade 3'. A replicação do RNA dá-se no citoplasma da célula hospedeira. As partículas virais são agregadas e envolvidas em membranas intracelulares, transportadas em vesículas citoplasmáticas pelo percurso secretor, sendo libertadas por exocitose (Ridpath, 2005).

Os pestivírus foram originalmente classificados nas espécies BVD, CSFV e BDV com base nos animais hospedeiros originários. Porém, esta classificação mostrou-se problemática pois alguns pestivírus não estão restritos somente a uma única espécie hospedeira (Ridpath, 2005). Por exemplo, o BVDV já foi isolado em animais domésticos, como bovinos, ovinos, suínos, caprinos, e em animais selvagens, como coelhos, búfalos, lamas, alpacas, girafas, camelídeos, antílopes, cervídeos, noutros ruminantes silvestres de vida livre ou de cativeiro, bem como noutros animais selvagens de África e América (Evermann e Barrington, 2005; Ridpath, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b; Vilček e Nettleton, 2006; Kahn *et al.*, 2007; Passler *et al.*, 2007). Estas espécies selvagens poderão ser consideradas reservatórios do BVDV (Gondim, 2006), podendo serem responsáveis por falhas em programas de erradicação do BVDV (Passler *et al.*, 2007).

Os viriões deste género são partículas esféricas com 40 a 60 nanómetros de diâmetro, possuem um invólucro lipídico derivado das membranas da célula hospedeira infectada, e são constituídos por uma cápside central, composta pela proteína viral C codificada e pelo RNA genómico, envolvida por uma bicamada lipídica. Os viriões são estáveis a pH entre 5.7 e 9.3, com estabilidade máxima a pH 7.4, ficando instáveis acima ou abaixo destes valores. A infectividade não é afectada por temperaturas baixas, mas diminui a temperaturas cerca de 40°C. Tal como outros vírus com invólucro, o BVDV é inativado por solventes orgânicos (éter e clorofórmio), detergentes e desinfectantes comuns (clorexidina, fenóis, iodóforos, aldeídos e hipocloritos), bem como por tratamento com Tripsina, etilenimina, irradiações com feixes de electrões e irradiações gama (Ridpath, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b). O vírus é

facilmente mantido em estado liofilizado ou congelado (-70°C) por vários anos (Gondim, 2006), mas provavelmente não persiste no ambiente por mais de duas semanas (Grooms *et al.*, 2006b).

Baseado no comportamento de outros flavivírus e pestivírus, colocou-se a hipótese que a ligação e entrada do vírus para dentro da célula são um processo com múltiplos passos, iniciando-se com a endocitose mediada pelo receptor, envolvendo as moléculas de superfície e as proteínas virais E^{ms} e E2 (Ridpath, 2005).

Como foi referido anteriormente, a ORF do genoma é traduzida numa poliproteína, composta por proteínas virais sob a seguinte ordem: N^{pro} – C – E^{ms} – E1 – E2 – p7 – NS2/3 – NS4A – NS4B – NS5A – NS5B (**Figura 1**). As proteínas estruturais associadas ao virião são a C, E^{ms}, E1 e E2. Por sua vez, as proteínas virais não estruturais que compõem a poliproteína são: N^{pro}, p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. A função, tamanho e características de cada proteína viral estão descritas na **Tabela 1** (Ridpath, 2005).

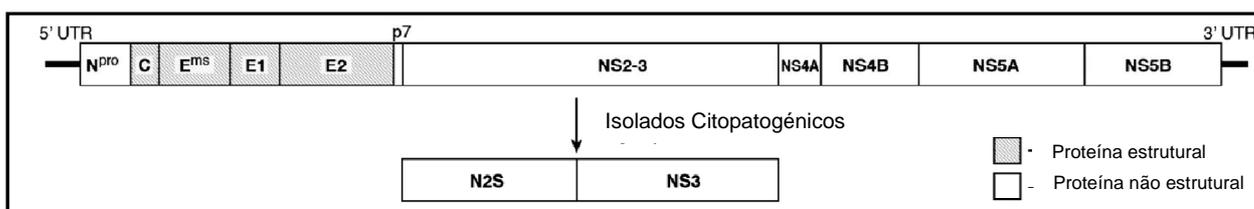


Figura 1 - Organização do genoma do vírus da Diarreia Viral Bovina. As proteínas estruturais estão marcadas a cinzento (Fonte: adaptado de Ridpath, 2005).

A replicação do RNA ocorre, tal como em outros flavivírus, através do complexo de replicação, composto pelo RNA viral e proteínas virais não estruturais, em associação com as membranas intracitoplasmáticas (Ridpath, 2005).

A alta frequência de mutações, a propensão à recombinação e a pressão selectiva pela resposta imune estimulada por infecções naturais ou por vacinação tem levado à criação de uma grande variedade de variantes genéticas e antigénicas do BVDV (Brock, 2003; Gondim, 2006). Os epítopes neutralizantes da glicoproteína E2 são um dos locais primários onde ocorrem variações por mutação (Brock, 2003). Assim, o BVDV apresenta uma grande variabilidade antigénica, sendo que dois grupos antigénicos principais já foram identificados: BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 (Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Houe, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Flores *et al.*, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Vilček e Nettleton, 2006; Kahn *et al.*, 2007; Passler *et al.*, 2007; OIE, 2008). Os dois génotipos podem ser diferenciados através de anticorpos monoclonais dirigidos contra as proteínas virais E2 e E^{ms} ou por análise genética (OIE, 2008).

Tabela 1 – Proteínas virais que compõem o vírus da BVD (Fonte: adaptado de Ridpath, 2005).

Proteína viral	Tamanho estimado (K Dalton)	Características	Epítotope(s) Neutralizantes	Função
N ^{pro}	20	Não estrutural	-	Autoproteólise Não é necessária para a replicação do RNA
C	14	Estrutural Conservada Altamente básica	-	Forma a nucleocápside do virião
E ^{ns}	48	Estrutural 7-9 locais de glicosilação	+	Glicoproteína associada ao envelope Actividade ribonuclease
E1	25	Estrutural 2-3 locais de glicosilação	-	Glicoproteína associada ao envelope Proteína integral de membrana
E2	53	Estrutural 4-6 locais de glicosilação A menos conservada das proteínas estruturais	+	Glicoproteína associada ao envelope Proteína integral de membrana Proteína estrutural imunodominante
P7	7	Não estrutural Região central carregada, rodeada por terminais hidrofóbicos	-	Função desconhecida Necessária para produzir vírus infeccioso mas não para a replicação de RNA
NS2/3	125	Não estrutural	-	NS2 tem um domínio de zinco
NS2	54	No biótipo citopatogénico,		NS2/3 e NS3 contêm RNA helicase e domínios serina protease N-terminal; sofre autoclivagem e permanece como proteína não estrutural da poliproteína viral
NS3	80	NS2/3 é clivada em NS2 e NS3 Conservada		Proteína não estrutural imunodominante
NS4A	7.2	Não estrutural Hidrofóbica	-	Cofactor da serina protease
NS4B	38-39	Não estrutural Hidrofóbica	-	Componente da replicase
NS5A	55-56	Não estrutural Fosforilada	-	Componente da replicase
NS5B	81-82	Não estrutural	-	Actividade RNA polimerase

Os vírus do genótipo BVDV-1 representam a maioria dos vírus vacinais e das estirpes de referência, enquanto os BVDV-2 foram identificados em surtos de Diarreia Viral Bovina aguda grave e doença hemorrágica na América do Norte (Deregt e Loewen, 1995; Flores, 2003; Flores *et al.*, 2005; Gondim, 2006; OIE, 2008). Contudo, o BVDV-2 não pode ser considerado como sinónimo de alta virulência, pois nos vírus isolados em campo nos EUA, aproximadamente 50% são BVDV-2, sendo muitos destes pouco patogénicos ou mesmo avirulentos (Flores, 2003). Portanto, uma das grandes consequências das diferenças antigénicas entre os dois genótipos é o nascimento de animais Persistentemente Infectados pelo BVDV-2 provenientes de mães vacinadas (vacina viva) contra o BVDV-1 (Ridpath, 2005). De acordo com as diferenças genómicas e antigénicas, a estirpe BVDV-1 proveniente da América do Norte pode ser separada em dois subgenótipos: BVDV-1a e BVDV-1b, que são distinguidos através da análise de

anticorpos monoclonais e de RT-PCR (Flores, 2003; Ridpath, 2005; Vilček e Nettleton, 2006). Pesquisas epidemiológicas sugerem que estirpes de BVDV-1b predominam em casos respiratórios, enquanto que a estirpe de BVDV-1a predomina em infecções fetais ocorridas tardiamente no decorrer da gestação (gestação >100 dias). Por sua vez, na Europa, as estirpes de BVDV-1 apresentam uma maior variabilidade que as suas homólogas da América do Norte, enquanto as estirpes de BVDV-2 possuem baixa incidência. Na Europa, o grupo BVDV-1 foi separado em 11 subgrupos: BVDV tipos 1a a 1k (Evermann e Barrington, 2005; Ridpath, 2005). No mesmo sentido, as estirpes de BVDV-2 do norte e sul da América foram separadas em dois subgrupos: BVDV-2a e BVDV-2b (Flores, 2003; Ridpath, 2005; Vilček e Nettleton, 2006).

Em Portugal, foram encontrados os genótipos 1a, 1b, 1d e 1e dentro das estirpes de BVDV-1, sendo que a mais predominante é a BVDV-1b. Também foi observada a presença de BVDV-2, obtida a partir de animais com sinais clínicos de doença hemorrágica (Barros *et al.*, 2006).

De acordo com a capacidade de produzir citopatologia em culturas celulares, os vírus de ambos os genótipos podem ser classificados num dos dois biótipos: citopatogénico (CP) ou não-citopatogénico (NCP). A grande maioria dos vírus encontrados na natureza são NCP, enquanto amostras CP são isoladas quase que exclusivamente de animais acometidos da Doença das Mucosas ou de surtos de doença pós-vacinal (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005; Ridpath, 2005; Kahn *et al.*, 2007; Passler *et al.*, 2007; OIE, 2008). Somente o tipo NCP atravessa a placenta, invade o feto e estabelece uma infecção persistente no feto, que é essencial para a propagação do vírus (Radostits *et al.*, 2000). Devido ao facto de apenas o vírus NCP estabelecer infecções persistentes, este biótipo é frequentemente escolhido para vacinas vivas modificadas, testes e pesquisas diagnósticas (Ridpath, 2005; Gondim, 2006). O biótipo NCP é, então, responsável por uma vasta gama de doenças congénitas, entéricas e reprodutivas (Radostits *et al.*, 2000).

Em culturas tecidulares, o vírus CP provoca danos graves nas células, incluindo vacuolização celular, destruindo-as completamente em 48-72 horas; por sua vez, o vírus NCP causa pequenas ou nenhuma mudança citopatogénica visíveis em culturas celulares, permanecendo as células infectadas normais (Deregt e Loewen, 1995; Andrews *et al.*, 2004).

Os dois biótipos do BVDV não são distinguíveis serologicamente. Contudo, a nível molecular, descobriu-se que nas células infectadas o vírus citopatogénico produz uma proteína adicional, não observada em células infectadas com o vírus citopatogénico. Esta proteína, considerada a marcadora dos vírus citopatogénicos, é designada de NS3 (ou p80) e é uma

pequena versão de outra proteína viral não estrutural de maiores dimensões (NS2/3 ou p125), presente em todas as células infectadas com BVDV (Deregt e Loewen, 1995). Estas proteínas são proteases virais. No caso de vírus citopatogénico, a proteína NS3 é originada através da clivagem proteolítica da NS2/3 ou, nalguns casos, por duplicação de genes (Deregt e Loewen, 1995; Ridpath, 2005). Assim, a presença da NS3 em vírus citopatogénicos e a sua ausência nos não-citopatogénicos implica que esta proteína confere citopatogenicidade (Deregt e Loewen, 1995).

A existência da proteína NS3 e o biótipo citopatogénico é, evidentemente, o resultado de alterações genéticas no biótipo NCP. Estas alterações incluem inserções de material genético a nível celular e duplicações ou deleções de genes virais (Deregt e Loewen, 1995). Deste modo, existe uma forte indicação que o vírus CP derive do vírus NCP através de mutação (Deregt e Loewen, 1995), que implica a recombinação do RNA viral NCP entre si, com RNA viral heterólogo ou com RNA da célula hospedeira (Kahn *et al.*, 2007).

4. Epidemiologia

4.1. Prevalência

A evidência do BVDV foi comprovada em muitos países pelo mundo. O BVDV tipo 1 é a forma predominante na natureza e o tipo 2 é associado a uma patologia hemorrágica grave. Para além da América do Norte, a BVD já foi relatada em vários países como o Reino Unido, Escócia, Noruega, Dinamarca, Suécia, Alemanha, Áustria, Itália, Suíça, França, Espanha, Portugal, Brasil, Cuba, Uruguai, Chile, Jordânia, Nova Zelândia, entre outros, sendo considerada de natureza ubíqua (Grooms *et al.*, 2006b).

A prevalência dos anticorpos antivirais no gado bovino varia entre países e pode variar entre regiões geográficas dentro do mesmo país (Kahn *et al.*, 2007). Por seu turno, os factores ambientais tais como a densidade da população, aptidão do gado (leite ou carne), tipo de exploração e as práticas de biossegurança influenciam a gravidade e a prevalência da doença em determinadas populações de animais (Houe, 1999; Brock *et al.*, 2005). Por exemplo, a influência do tamanho da população na distribuição do BVDV revelou que os rebanhos de maior dimensão são mais prováveis de serem infectados do que os animais de rebanhos pequenos (Ribeiro e Pereira, 2004; Talafha *et al.*, 2008).

Apesar da prevalência da infecção variar entre estudos, a infecção tende a ser endémica em algumas populações (Houe, 1999). Estudos serológicos demonstraram diferenças consideráveis na prevalência de bovinos positivos ao anticorpo, variando de 60 a 90% (Houe, 1999; Radostits

et al., 2000; Flores *et al.*, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007). A densidade bovina, as práticas de manejo (animais de estábulo em comparação com animais de campo) e o tipo de vacina utilizada provavelmente contribuem para essas diferenças (Houe, 1999; Radostits *et al.*, 2000). Vários estudos mostraram que a prevalência dos bovinos Permanentemente Infectados (PI) esteja compreendida entre 0,5% e 2% da população geral de bovinos (Houe, 1999; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Gunn *et al.*, 2004; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b; OIE, 2008). Em rebanhos individuais, a prevalência de bovinos PI pode ser substancialmente maior (Grooms *et al.*, 2006b), chegando a valores superiores a 90% antes de os vitelos atingirem 3-4 meses de idade, se a vacinação se praticar normalmente (Houe, 1999; Kahn *et al.*, 2007). Está estimada uma prevalência entre 10 a 50% de haver pelo menos um animal PI nos rebanhos (Grooms *et al.*, 2006b).

4.2. Transmissão

Os bovinos jovens PI (com biótipo NCP) são a principal fonte de infecção para outros animais, eliminando para o ambiente grandes quantidades de vírus durante toda a vida (Deregt e Loewen, 1995; Houe, 1999; Flores *et al.*, 2005; Thurmond, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007). Para além dos animais PI, animais com infecção aguda também excretam o vírus por alguns dias (Flores, 2003).

A transmissão de agentes infecciosos, como é o caso do BVDV, é influenciado por quatro factores: infecciosidade da estirpe viral, número de contactos adequados entre animais infectados e susceptíveis por unidade de tempo, duração do período infeccioso (ou a prevalência de animais infectados na exploração durante um determinado período), e pela presença de animais susceptíveis que não possuem anticorpos seroneutralizantes (imunidade humoral) e/ou imunidade celular necessária para prevenir a infecção (Thurmond, 2005). Por sua vez, a dose infecciosa do vírus é altamente dependente da via de transmissão (Houe, 1999).

A disseminação do BVDV entre animais e entre explorações pode ocorrer de forma horizontal e vertical.

4.2.1. Transmissão horizontal

A transmissão horizontal pode ser directa (focinho-focinho, coito e mucosa-mucosa) ou indirecta (focinho-secreções/excreções, focinho-feto abortado/placenta e contacto com secreções/excreções) (Houe, 1999; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003).

O contacto directo de um animal susceptível com um animal PI e/ou seus fluidos corporais é o modo mais eficiente de transmissão do vírus em condições naturais. O vírus também é transmitido pelo contacto directo com animais portadores de infecção aguda, apesar da quantidade de vírus ser consideravelmente menor e o período de eliminação mais limitado (Houe, 1999; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007). Em explorações de carne, a mistura acidental de machos PI com fêmeas reprodutoras susceptíveis durante a época de reprodução pode resultar num grande surto de MD (Radostits *et al.*, 2000).

A transmissão indirecta pode ocorrer por meio de insectos hematófagos ou por vectores mecânicos contaminados, como luvas de palpação transrectal anteriormente utilizadas, agulhas e material cirúrgico contaminado, espéculos nasais, uso de vacinas vivas ou contaminadas, ou através dos tratadores de animais (Houe, 1999; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Thurmond, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007). Este tipo de transmissão depende da estabilidade do vírus fora do hospedeiro (Gondim, 2006).

O modo de infecção mais comum ocorre por meio da ingestão ou da inalação do vírus (Kelling, 2004; Larson, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). O vírus foi isolado de descargas nasais, aerossóis, saliva, lágrimas, fezes, urina, fluidos uterinos e leite (Andrews *et al.*, 2004; Larson, 2005; Thurmond, 2005; Gondim, 2006). Os aerossóis que infectam a mucosa nasal encontram-se suspensos no ar e podem manter a infecciosidade em distâncias curtas, entre 1,5 metros a 10 metros de distância (Evermann e Barrington, 2005; Larson, 2005).

A transmissão horizontal também pode ocorrer através de sémen colhido de touros PI ou agudamente infectados pelo BVDV e inseminado em vacas susceptíveis (Houe, 1999; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Thurmond, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). O uso de sémen proveniente de bovinos com infecção transitória tem o potencial para introduzir o vírus num grupo ou exploração de animais susceptíveis, mas as taxas de concepção estarão dentro de padrões normais (Houe, 1999; Radostits *et al.*, 2000) pois apenas uma pequena proporção de novilhas seronegativas inseminadas torna-se infectada (Gondim, 2006), representando um baixo risco de transmissão do BVDV via sémen proveniente de machos com infecção aguda (Thurmond, 2005). Contudo, quando a infecção se estabelecer nesse grupo ou exploração, haverá a sua amplificação através de um ciclo secundário de transmissão provocado pelas novilhas que foram infectadas pelo sémen (Houe, 1999; Radostits *et al.*, 2000).

A transmissão entre bovinos e ovinos já foi demonstrada, apesar da importância desta transmissão ainda não ter sido determinada (Carlsson e Belak, 1987 citado por Larson, 2005; Brock, 2004; Thurmond, 2005; Grooms *et al.*, 2006b).

4.2.2. Transmissão vertical

A transmissão vertical procede-se de uma geração para outra (por via uterina). Consequentemente, pode-se dizer que todos os bovinos PI são produzidos pela transmissão vertical. Porém, na maioria dos casos, esta é precedida da transmissão horizontal da mãe e, seguidamente, ocorre a infecção transplacentária do feto, em vacas PI ou com infecção aguda (Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b).

Na transferência embrionária é possível haver transmissão do vírus para o feto se a fêmea dadora tiver infecção aguda ou persistente e o embrião não foi adequadamente lavado; se a fêmea receptora tiver infecção aguda ou for PI; ou se o soro fetal bovino usado para lavar o embrião conter BVDV (Thurmond, 2005). Pode, então, ocorrer transmissão vertical da fêmea receptora para o feto, resultando em morte embrionária/fetal ou no nascimento de um vitelo PI Brock *et al.*, 1991 citado por Larson, 2005).

4.2.3. Transmissão dentro da exploração

A velocidade de transmissão do BVDV dentro dos rebanhos depende da prevalência de animais PI, da taxa de contactos entre animais e da virulência das estirpes virais (Houe, 1999; Thurmond, 2005). A introdução de um animal PI num rebanho pode resultar na rápida disseminação do vírus entre a maioria dos bovinos susceptíveis em menos de seis meses. Contrariamente, se um bovino com quadro agudo for a fonte de vírus, a disseminação do BVDV pode requerer um período maior (Grooms *et al.*, 2006b).

4.2.4. Transmissão entre explorações

A disseminação do BVDV entre explorações, na maioria das vezes, ocorre pela aquisição de novos bovinos PI ou que estejam prenhes de fetos PI (Houe, 1999; Thurmond, 2005). As operações de compra de animais dos últimos 5 anos da exploração apresentam alto risco de possuírem animais PI. A compra de novos bovinos que estejam a incubar a infecção aguda é uma fonte importante para introdução do vírus no rebanho (Grooms *et al.*, 2006b).

A exposição a outros bovinos pela cerca, pelos pastos comunitários ou por feiras e exposições podem ser importantes vias de transmissão de rebanho para rebanho (Houe, 1999; Thurmond, 2005; Grooms *et al.*, 2006b).

4.3. Importância económica

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

As perdas devidas a várias formas da infecção pelo BVDV incluem diminuição da produção de leite, diminuição da taxa de concepção, desordens respiratórias, entre outras doenças associadas com a imunossupressão, bem como morte entre os animais com infecção aguda, abortos e outras desordens reprodutivas, e nascimento de animais PI (Houe, 1999; Chi *et al.*, 2002; Houe 2003; Gunn *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2005). A diminuição da produção leiteira causa perdas na ordem dos 10,7€ por 1000 litros de leite em infecções médias e 19€ por 1000 litros de leite em infecções graves (Fourichon *et al.*, 2005).

Actualmente, as perdas reprodutivas são as consequências economicamente mais importantes associadas à infecção pelo BVDV (Grooms, 2006a). Assim, as perdas económicas causadas pela introdução do BVDV em explorações de fêmeas gestantes susceptíveis são devidas aos abortos, defeitos congénitos, nados-mortos, aumento da mortalidade neonatal, crescimento retardado perinatal, performance reprodutiva suboptimizada devido à infertilidade, mortes provocadas pela MD e pela eliminação precoce de animais PI. Grandes perdas ocorrem devido a infecção fetal ao longo dos primeiros 2-3 anos seguintes à introdução da infecção na exploração. As perdas económicas são grandes quando ocorrem epidemias fatais da MD (Radostits *et al.*, 2000).

O BVDV parece estar associado ao aumento do risco de mamites, retenções placentárias e intervalos entre partos maiores (Niskanen 1995 citado por Houe, 2003; Heuer, 2007). Quando há exposição do rebanho ao BVDV há um aumento de 7% na incidência de mamites (Waage, 2000 citado por Houe, 2003), tendo grande impacto económico, pois provocam, em média, custos totais de 11€ por 1000 litros de leite (78€/vaca/an) (Fourichon *et al.*, 2005).

Num rebanho infectado, espera-se que a magnitude das perdas sofra flutuações. Podem ser relativamente grandes se a doença ocorrer numa escala epidémica depois de transmissão horizontal a fêmeas gestantes não imunes, mas são consideravelmente baixas quando a infecção endémica é mantida na exploração através da presença de descendentes virémicos (Radostits *et*

al., 2000). Por exemplo, nas vacarias de leite, em casos de surtos, os custos podem ascender aos 96€/vaca/ano. Por sua vez, nas explorações de carne as perdas podem atingir os 58€/ano/vaca (Gunn *et al.*, 2004). Contudo, uma fase de grandes perdas pode ocorrer se se deixar as novilhas atingirem a idade de reprodução sem serem expostas à infecção ou vacinação (Radostits *et al.*, 2000).

Infecções com estirpes de BVDV altamente virulentas causam sinais clínicos graves e morte depois da infecção aguda dar origem a perdas económicas substanciais. Por exemplo, o total anual nacional de perdas na Dinamarca, numa incidência anual estimada de infecções agudas de 34%, as perdas totais anuais foram estimadas em 20 milhões de dólares (14,1 milhões de euros) por um milhão de partos quando calculadas devido à presença de uma estirpe de baixa virulência. Com incidência semelhante, as perdas devidas a uma estirpe de BVDV de alta virulência ascendem a 57 milhões de dólares (40,4 milhões de euros) por um milhão de partos. As infecções de BVDV com baixa virulência causam perdas máximas numa incidência de 45%, enquanto infecções de alta virulência atingem perdas máximas aos 65% de incidência (Houe, 1999). Na Noruega, as perdas no início do programa de erradicação foram estimadas em 10 dólares por parto (ou 10 milhões de dólares, 7,1 milhões de euros, por um milhão de partos) (Valle *et al.*, 2000 citado por Houe, 2003; Valle *et al.*, 2005), enquanto no Reino Unido as perdas foram calculadas entre 8 a 46 milhões de dólares (5,7 a 32,6 milhões de euros) como total nacional (Bennett *et al.*, 1999 citado por Houe, 2003). Na Nova Zelândia as perdas estimadas em explorações leiteiras são equivalentes a 6,3 milhões de euros por um milhão de partos (Heuer *et al.*, 2007). No Canadá, os custos totais anuais numa exploração de 50 vacas leiteiras foram calculadas em 48 dólares (34 euros) por animal (Chi *et al.*, 2002).

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

Em Portugal estima-se que as perdas devidas à infecção pelo BVDV possam atingir os 3000€/exploração/ano, considerando que apenas 7% das explorações portuguesas estejam livres de BVD (Gunn *et al.*, 2005).

A importância económica da doença e o resultado de várias estratégias de controlo deveriam ser avaliadas em termos de custos e benefícios para a sociedade (Houe, 1999). O

impacto económico dá-nos uma visão da importância da doença (Houe, 2003). Quando se decide prevenir a doença, é importante termos estimativas fidedignas das perdas associadas com o surto (Gunn *et al.*, 2004). Assim, as análises de custo-benefício de programas de controlo são altamente dependentes dos riscos de novas infecções sob diferentes circunstâncias, bem como da estirpe de vírus envolvida (Houe, 1999).

5. Patogenia e Quadro Clínico

O quadro clínico após uma infecção é complexo e depende de vários factores. Os factores relacionados com os hospedeiros que influenciam o seu estado clínico incluem a imunocompetência frente ao BVDV, a idade do animal, o estágio da gestação, a idade fetal no momento da infecção, o estatuto imunitário (passivo ou activo por exposição ou vacinação) e a presença de stresse ambiental no momento da infecção. Além disso, a diversidade genética, a variação antigénica e as diferenças de virulência entre as estirpes de BVDV podem causar variações da resposta clínica à infecção (Larson, 2005; Brock *et al.*, 2005; Evermann e Barrington, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b).

Assim, o decurso da doença causada pelo BVDV varia de acordo com a sua gravidade, duração, sistemas orgânicos e animais afectados (Kahn *et al.*, 2007).

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

Em bovinos não gestantes e imunocompetentes, a doença pode apresentar evolução subclínica ou clínica (hiperaguda ou aguda) com uma forma trombocitopénica e síndrome hemorrágica (Radostits *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2005).

5.1.1. Infecção subclínica

Estima-se que 70 a 90% das infecções pelo BVDV em animais imunocompetentes e seronegativos ocorram sem manifestações de sinais clínicos (Evermann e Barrington, 2005). Muitos animais infectados pelo BVDV apresentam infecções subclínicas que apenas provocam febre ligeira (passando despercebida), leucopenia e desenvolvimento de anticorpos seroneutralizantes. As infecções subclínicas explicam os títulos de seroneutralização positiva para BVDV encontrados na maioria dos bovinos não vacinados (Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b). Em vacas de leite, a diminuição da produção leiteira tem sido associada a infecções subclínicas (Evermann e Barrington, 2005). Ocasionalmente, estirpes de maior patogenicidade podem provocar doença clínica transitória caracterizada por inapetência, depressão, febre,

diarreia ligeira, leucopenia transitória com recuperação do animal em poucos dias (Radostits *et al.*, 2000).

A replicação viral ocorre no tracto respiratório e tecidos linfóides adjacentes (Evermann e Barrington, 2005). Os bovinos que apresentam infecção subclínica podem persistir virémicos 4-15 dias após a infecção e desenvolver anticorpos séricos contra o BVDV em 2-4 semanas após exposição (Gondim, 2006).

Os animais PI da exploração deverão ser a fonte de infecção mais provável (Radostits *et al.*, 2000; Brock, 2003; Larson, 2005; Grooms, 2006a; Passler *et al.*, 2007; OIE, 2008).

5.1.2. Infecção clínica aguda

A infecção aguda pelo BVDV é frequentemente definida pela doença clínica que ocorre em bovinos imunocompetentes que não são PI (Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005). Esta síndrome ocorre geralmente em bovinos com idades compreendidas entre 6 a 24 meses (Evermann e Barrington, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b) e sendo a idade referida como a principal causa em bovinos que são seronegativos, isto é, a imunidade passiva diminuiu mas a imunidade activa ainda não foi adquirida (Grooms *et al.*, 2006b). O período de incubação dos quadros agudos varia de 5 a 7 dias, apresentando como sinais clínicos após infecção: febre bifásica (40°C), leucopenia, depressão, anorexia, respiração rápida, corrimentos oculares e nasais, erosões e ulcerações orais, diarreia e redução na produção leiteira nas primíparas (Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b; OIE, 2008). Poderão estar presentes erosões epiteliais no espaço interdigital, bordo coronário, tetos e vulva (Evermann e Barrington, 2005). A virémia pode persistir até 15 dias, período este em que o vírus é eliminado em pequenas quantidades (Grooms *et al.*, 2006b). Contudo, a duração dos sinais clínicos é variável e depende da duração da virémia, virulência do vírus infectante, presença de infecções secundárias e capacidade regenerativa dos tecidos afectados (Evermann e Barrington, 2005).

A doença é autolimitante e transitória, leve ou por vezes inaparente, com alta morbilidade (30 a 90%) e mortalidade muito baixa ou ausente (Flores, 2003; Gondim, 2006; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008).

Infecções neonatais pelo BVDV podem resultar em enterite ou pneumonia (Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005), mas isso apenas se torna possível quando existe uma falha na transferência passiva (Grooms *et al.*, 2006b). Fêmeas imunocompetentes fornecem imunidade colostrar às suas crias, protegendo-as contra a virémia nos primeiros 2-4 meses de vida,

dependendo da qualidade e quantidade de colostro consumido, a partir dos quais os níveis de anticorpos diminuem, deixando de proteger os vitelos contra a infecção (Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005; Thurmond, 2005). No entanto, a infecção viral em bovinos jovens sem imunidade passiva apropriada ou suficiente pode resultar em doença secundária causada pelos efeitos imunossupressores da doença (Grooms *et al.*, 2006b; OIE, 2008).

Nas formas leves da doença raramente se observam lesões macroscópicas (Kahn *et al.*, 2007). No entanto, os casos graves de doença aguda por BVDV em bovinos infectados são causados por lesões no tecido epitelial gastrointestinal, tegumentar e do sistema respiratório. Nos animais infectados, os antígenos virais podem ser detectados nas superfícies epiteliais da língua, esófago, intestino, brônquios e pele, bem como nas células fagocitárias mononucleares do timo, linfonodos, placas de Peyer, tonsilas e do baço (Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005). Os primeiros tecidos a serem infectados são o tracto respiratório e as tonsilas. A partir destes, o BVDV dissemina-se para as superfícies do epitélio e tecido linfóide (Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007), distribuindo-se pelo corpo através dos leucócitos (Gondim, 2006). A replicação viral efectua-se nas tonsilas, timo e íleo. Os megacariócitos e linfócitos constituem importantes alvos do vírus, o qual provoca a necrose destas células e prejudica a função das que sobrevivem à infecção (Evermann e Barrington, 2005; Gondim, 2006). A virémia pode ser detectada 24 horas pós-infecção, sendo detectada a presença do vírus na urina 48 horas pós-infecção. O curso da virémia e a presença do vírus na urina estão dependentes da presença ou ausência de anticorpos colostrais (Evermann e Barrington, 2005).

5.1.3. Infecção clínica hiperaguda

A forma hiperaguda da BVD tem alta morbidade e alta mortalidade em todos os grupos etários de gado, sendo causada por estirpes de BVDV-2 NCP (Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; OIE, 2008). Os surtos são mais comuns em explorações leiteiras em que houve entrada de animais recentemente ou, então, com programas vacinais inadequados (Radostits *et al.*, 2000). Os surtos de infecção hiperaguda têm alta incidência de abortos (Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b).

As lesões macroscópicas são semelhantes em aparência às da MD, não sendo normalmente possível diferenciar entre as duas formas apenas com base histopatológica (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005). Observam-se os gânglios linfáticos aumentados de tamanho, erosões e ulcerações do tracto gastrointestinal, hemorragias petequiais e

equimóticas nas superfícies serosas das vísceras e depleção extensiva de linfócitos (Radostits *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2007). Nesta forma, a pneumonia deverá ser o quadro clínico mais óbvio (Radostits *et al.*, 2000).

A duração da doença pode variar de 3 a 7 dias (Kahn *et al.*, 2007).

5.1.4. Síndrome hemorrágica e Trombocitopenia

Infecções agudas pelo BVDV em bovinos podem causar a síndrome hemorrágica. Estas infecções são caracterizadas clinicamente por uma trombocitopenia marcada, diarreia sanguinolenta, hemorragias petequiais e equimóticas da conjuntiva, esclerótica e membrana nictitante, epistaxis, hemorragia nas superfícies mucosas da boca e vulva, hifema, hemorragia anormal nos locais de injeção ou de mordeduras de insectos, pirexia (41-42°C), desidratação, leucopenia e morte (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008). Pode ocorrer estase ruminal. Contagens plaquetárias encontram-se abaixo de 25000 μ l (Radostits *et al.*, 2000).

A síndrome hemorrágica parece estar associada a estirpes NCP de BVDV tipo 2 (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; OIE, 2008), resultando em broncopneumonia multifocal, atrofia da medula óssea vermelha e necrose e erosões da membrana mucosa do tracto gastrointestinal (Gondim, 2006).

Além de bovinos jovens, onde apresenta alta mortalidade, pode afectar bovinos (Flores, 2003; OIE, 2008).

A patogenia da hemorragia relaciona-se com a trombocitopenia induzida pelo vírus, mas o seu mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005). As infecções do BVDV que causam trombocitopenia, devida à destruição plaquetária, foram reproduzidas experimentalmente em bovinos (Grooms *et al.*, 2006b). No entanto, pensa-se que a trombocitopenia induzida pela infecção viral é devida ao efeito directo do vírus nas plaquetas, resultando na sua destruição ou sequestro e na diminuição da produção plaquetária (Deregt e Loewen, 1995; Evermann e Barrington, 2005; OIE, 2008).

A taxa de casos fatais ronda os 25%, no entanto os animais que sobrevivem podem recuperar e desenvolverem-se normalmente ou tornam-se inviáveis (Radostits *et al.*, 2000).

5.2. Infecção intra-uterina (congénita)

O BVDV causa perdas reprodutivas significativas em fêmeas gestantes não imunes (Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005). Após infecção das fêmeas, o BVDV é

capaz de atravessar a placenta e infectar o feto (Flores, 2003; Liebler-Tenorio, 2005; Kahn *et al.*, 2007). O vírus pode ser transmitido através de monta natural ou por inseminação artificial (Fray *et al.*, 2000; Radostits *et al.*, 2000), podendo levar a falhas na fertilização, reabsorção embrionária (com retorno ao estro em intervalos regulares ou irregulares), abortos, mumificação fetal, nados-mortos, nascimento de animais fracos e inviáveis que morrem logo ou têm crescimento retardado, ou nascimento de animais PI (Radostits *et al.*, 2000; Greiser-Wilke *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2005; Grooms, 2006a; Grooms *et al.*, 2006b; OIE, 2008). As consequências da infecção fetal normalmente são observadas desde várias semanas a vários meses depois da infecção materna e são determinadas pela fase da gestação em que a fêmea é infectada, biótipo (CP / NCP) e pela estirpe do vírus (Flores, 2003; Liebler-Tenorio, 2005; Gondim, 2006).

O BVDV causa falhas reprodutivas em animais susceptíveis durante as seguintes fases do ciclo reprodutivo (**Figura 2**):

5.2.1. Infecção anterior à inseminação

A exposição dos animais ao vírus durante o ciclo éstrico, antes da inseminação, pode provocar uma diminuição da taxa de concepção, devida a ovulação tardia/infertilidade com repetição do cio (Andrews *et al.*, 2004; Liebler-Tenorio, 2005; Gondim, 2006; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008). No entanto, estas alterações são passageiras e o animal apresenta retorno ao ciclo éstrico (Flores, 2003).

O BVDV tem sido associado a ovarites em novilhas inférteis (Radostits *et al.*, 2000; Grooms *et al.*, 2006b). Vacas PI podem apresentar alterações morfológicas nos ovários, sugerindo uma redução na actividade ovárica. A disfunção ovárica é uma das vias pela qual a infecção por BVDV causa diminuição das taxas de concepção (Liebler-Tenorio, 2005; OIE, 2008).

5.2.2. Infecção venérea

A inseminação de novilhas seronegativas e livres de vírus com sémen contaminado com BVDV pode provocar taxas de concepção inicialmente baixas, seguidas de concepções normais, seroconversão contra o vírus e nascimento de vitelos normais sem evidência da infecção (Gondim, 2006).

O BVDV pode estar presente no sémen dos touros, tanto devido a infecções persistentes como a infecções agudas transitórias pós-natais do touro (Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005; OIE, 2008). A qualidade do sémen em touros infectados pode ser anormal,

tendo como resultado a redução da fertilidade (OIE, 2008). Noutras situações, o sémen de um touro PI imunotolerante poderá ser normal e as taxas de gestação das novilhas suas descendentes podem ser normais, sendo que os espermatozóides de um animal infectado não contêm necessariamente o vírus (Liebler-Tenorio, 2005). Infecções agudas de touros imunocompetentes e seronegativos com o BVDV podem provocar a eliminação do vírus pelo sémen para além do período de virémia (Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; OIE, 2008). Tanto na infecção aguda como na infecção persistente, pode ocorrer a deterioração da qualidade do sémen, caracterizada pela diminuição da motilidade e anomalias morfológicas (Flores, 2003). A quantidade de vírus no sémen de um touro com infecção aguda é muito menor do que aquela encontrada no sémen de touros PI (Paton *et al.*, 1989 citado por Larson, 2005).

Os locais onde ocorre maior replicação do vírus no tracto genital masculino são as vesículas seminais e as glândulas prostáticas, causando a excreção no fluido seminal (Liebler-Tenorio, 2005).

5.2.3. Infecção durante o período embrionário (0-45 dias de gestação)

Infecções naturais de novilhas seronegativas 4 dias após a inseminação provocam virémia entre 8 a 17 dias e as taxas de concepção e de gestação diminuem, comparativamente com novilhas não infectadas (Flores, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Brock *et al.*, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Gondim, 2006; Kahn *et al.*, 2007). A infecção pode, ainda, dificultar a fixação do embrião ao útero, ou mesmo que esta fixação ocorra, pode provocar morte embrionária e perda precoce da gestação, sendo o embrião reabsorvido (Evermann e Barrington, 2005). As novilhas infectadas em que a concepção fracassou retornam normalmente ao estro cerca de 20 dias depois da inseminação (Radostits *et al.*, 2000).

5.2.4. Infecção após o período embrionário entre 45-125 dias de gestação

Depois de infectar a fêmea gestante não imune, o vírus tem a capacidade de atravessar a barreira placentária e invadir o feto. A infecção fetal pode provocar um vasto espectro de alterações, desde reabsorção embrionária, atraso no crescimento fetal, morte fetal, defeitos congénitos, até à infecção persistente do feto e nascimento de animais infectados para toda a vida e sem manifestações clínicas (Greiser-Wilke *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). O resultado da infecção depende do estágio de desenvolvimento fetal, embora o risco para o feto seja mais alto no início da gestação (Radostits *et al.*, 2000). A infecção do feto entre os 50 e 100 dias de gestação pode,

também, provocar morte e expulsão fetal (aborto) em dias a meses após a infecção fetal, ou mumificação (Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008). Contudo, a sobrevivência do feto é comum e pode atingir os 70% (Radostits *et al.*, 2000).

Se a infecção do feto com um isolado NCP do BVDV ocorrer entre os 45 a 125 dias de gestação, não haverá desenvolvimento de anticorpos seroneutralizantes e o animal acaba por assumir o BVDV como se fosse seu, nascendo com infecção persistente (Castrucci *et al.*, 1991; Deregts e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Larson, 2005; Brock *et al.*, 2005; Evermann e Barrington, 2005; Flores *et al.*, 2005; Grooms, 2006a; Kahn *et al.*, 2007). O feto, à nascença, será positivo ao vírus, mas seronegativo ao vírus persistente, pois durante este período da gestação o feto ainda não tem o seu sistema imunitário desenvolvido (Andrews *et al.*, 2004).

5.2.5. Infecção durante o período fetal entre 125 e 175 dias de gestação: Defeitos congênitos

A infecção transplacentária do feto aproximadamente entre os 125 e 175 dias de gestação pode provocar defeitos congênitos (Flores, 2003; Brock *et al.*, 2005; Gondim, 2006; Grooms, 2006a; Grooms *et al.*, 2006b). Este período de desenvolvimento corresponde ao período final da organogênese do sistema nervoso e do desenvolvimento do sistema imunitário do feto, podendo resultar na produção de uma resposta inflamatória frente ao BVDV (Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005). Neste estágio de gestação, a infecção pelo BVDV pode inibir o crescimento ou a diferenciação celular ou causar lise celular (Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b).

Os defeitos congênitos mais comuns induzidos pela infecção incluem malformações no sistema nervoso central (microcefalia, hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, hipomielinogênese) e deficiências oculares, tais como atrofia da retina, neurite do nervo óptico, cataratas e microftalmia com displasia da retina, traduzindo-se em vários graus de cegueira após o nascimento. Animais nascidos com hipoplasia cerebelar são incapazes de permanecerem em estação e de andarem normalmente após o parto. Pode-se, também, verificar braquignatismo, deformações músculo-esqueléticas, alopecia, hipotricose, artrogripose, restrição ao crescimento, hipoplasia pulmonar e aplasia tímica (Baker, 1987 citado por Larson, 2005; Radostits *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 2004; Brock *et al.*, 2005; Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio,

2005; Grooms, 2006a; OIE, 2008). Os vitelos podem ser mais pequenos que o normal e ter o pêlo encaracolado (Larsson *et al.*, 1991).

Em muitos rebanhos, as malformações são as únicas lesões que sugerem a presença do vírus (Flores, 2003).

5.2.6. Infecção no último terço de gestação (entre os 180 dias e o final da gestação)

A infecção do feto com o BVDV depois dos 150 dias de gestação causa resposta imunitária e eliminação do vírus (Brock *et al.*, 2005; Grooms, 2006a; OIE, 2008). O animal nasce seropositivo, mas livre do vírus. Para detectar este tipo de infecção, o soro deve ser colhido antes da ingestão do colostro (Grooms *et al.*, 2006b). Estes vitelos são normais ao nascimento e têm anticorpos neutralizantes pré-colostrais contra o BVDV (Brock *et al.*, 2005; Grooms, 2006a; OIE, 2008).

As infecções intra-uterinas tardias também podem provocar o nascimento de vitelos fracos, mas raramente levam ao aborto. Em suma, abortos em qualquer fase de gestação podem ser atribuídos ao BVDV, apesar destes serem mais comuns no primeiro trimestre de gestação (Brock *et al.*, 2005; Evermann e Barrington, 2005; Grooms, 2006a; Grooms *et al.*, 2006b; Liebler-Tenorio, 2005).

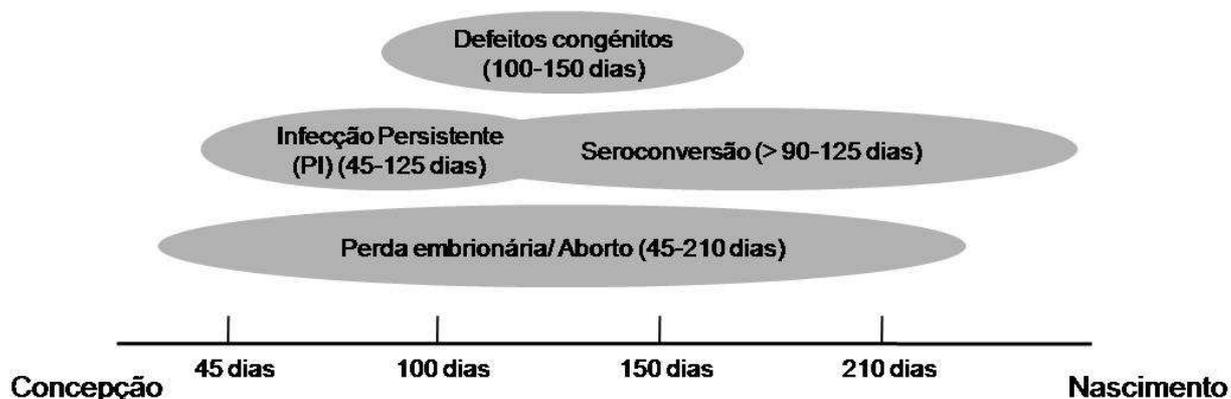


Figura 2 - Efeito do estágio de gestação no momento da infecção de fêmeas gestantes susceptíveis (Fonte: adaptado de Larson, 2005).

5.3. Animais Persistentemente Infectados

A infecção do feto com estirpes não-citopatogénicas do BVDV antes do desenvolvimento da imunocompetência fetal pode vir a originar vitelos portadores do BVDV para toda a vida e imunotolerantes ao vírus (Flores, 2003; Brock *et al.*, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b). Estima-se que 2 a 5% dos fetos infectados *in utero* pelo BVDV

permanecem infectados persistentemente (Flores, 2003). Os bovinos persistentemente infectados pelo BVDV podem parecer clinicamente saudáveis, no entanto são virémicos e eliminam o vírus constantemente e em grandes quantidades em secreções e excreções (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2005; Kahn *et al.*, 2007). Nalguns animais PI, o antigénio viral encontra-se espalhado por vários tecidos, tais como cerebelo e outras partes do cérebro, baço, rins, pulmões e em algumas regiões do intestino (Deregt e Loewen, 1995; Liebler-Tenorio, 2005).

Apesar de serem imunotolerantes ao BVDV, os bovinos PI são imunocompetentes em relação a outros antigénios (Radostits *et al.*, 2000; Liebler-Tenorio, 2005). A imunotolerância é específica para a estirpe NCP do vírus infectante e, por essa razão, bovinos PI podem responder imunologicamente a estirpes heterólogas do BVDV (Deregt e Loewen, 1995; Flores, 2003; Gondim, 2006). Por este motivo, os bovinos PI podem ser seropositivos ao BVDV (Grooms *et al.*, 2006b). No entanto, raramente se detectam anticorpos anti-BVD em bovinos PI que não foram vacinados ou que não sofreram sobreinfecção com um BVDV antígenicamente heterólogo (Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008).

As fêmeas PI produzem crias PI, as quais podem resultar na produção de uma linha familiar PI, sendo provavelmente o mecanismo de manutenção do BVDV na população bovina (Fray *et al.*, 2000; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007). Contudo, estudos efectuados por Wittum *et al.* (2001) sugerem que é um evento pouco comum, pois a maioria dos vitelos PI são o resultado de infecções agudas das progenitoras durante a gestação (Wittum *et al.*, 2001).

Os bovinos PI têm maior probabilidade de desenvolver a Doença das Mucosas, de contraírem outras doenças e de ter menor tempo de vida, sendo frequente morrerem antes dos 2 anos de idade (Flores, 2003; Kahn *et al.*, 2007). Observa-se uma taxa de mortalidade de 50% nos 12 primeiros meses de vida e acredita-se que menos de 10% das novilhas PI repostas no rebanho atingem a lactação (Liebler-Tenorio, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). Os vitelos PI podem nascer com tamanho abaixo do normal e apresentar taxa de crescimento mais lenta, alterações reprodutivas e morte precoce (Liebler-Tenorio, 2005; Gondim, 2006; Kahn *et al.*, 2007). Nos animais PI que atingem a idade reprodutiva, as fêmeas podem apresentar perdas embrionárias e fetais, enquanto os machos podem apresentar alteração na qualidade do sémen (Flores, 2003). Por outro lado, alguns animais PI estão predispostos a infecções resultando em pneumonia e enterite, que podem tornarem-se crónicas e não responderem ao tratamento (Gondim, 2006; Kahn *et al.*, 2007). A doença subclínica que, eventualmente, se torna clínica (agudiza) ou imunossupressora, permitindo o aparecimento de infecções bacterianas secundárias, pode

explicar os gastos excessivos em tratamentos e a mortalidade em bovinos PI. As lesões *post-mortem*, como a glomerulite e a encefalite, foram observadas em animais PI (Grooms *et al.*, 2006b).

Alguns animais podem apresentar evidências histológicas da infecção, como nefrite intersticial mononuclear, hepatite portal mononuclear, necrose focal e infiltrado mononuclear do epitélio do esófago e da língua, encefalite mononuclear e hiperplasia linfóide peribronquiolar (Gondim, 2006).

5.4. Doença das Mucosas

A MD é a forma mais grave da infecção pelo BVDV e ocorre quando bovinos imunotolerantes ou PI ao biótipo não-citopatogénico do vírus da Diarreia Viral Bovina tornam-se superinfectados por um biótipo citopatogénico do BVDV, o qual é estreitamente homólogo com o vírus NCP persistentemente infectado (Edwards *et al.*, 1991; Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Evermann e Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008). Deste modo, nem todas as combinações dos vírus NCP e CP resultam em MD (Grooms *et al.*, 2006b). A MD afecta animais entre os 6 meses e os 2 anos de idade, possui baixa morbidade e mortalidade próxima dos 100%, e ocorre 2-3 semanas após o desenvolvimento do vírus CP antígenicamente homólogo (Flores, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Gondim, 2006).

A origem do vírus CP pode ser externa, como foi demonstrado pela ocorrência comprovada da MD após o uso de vacinas do BVDV vivo modificado ou por vírus proveniente de outros animais. Geralmente, o vírus CP heterólogo surge a partir do biótipo NCP em animais PI através de recombinação genética ou mutação, fazendo com que o vírus CP fique antígenicamente idêntico ao vírus NCP, resultando em MD (Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; OIE, 2008). Os bovinos que desenvolvem a MD devido à exposição ao vírus CP de origem externa produzem habitualmente anticorpos antivirais (Kahn *et al.*, 2007).

A MD apresenta diferentes formas clínicas. As diferenças de linhagem entre os biótipos NCP e CP do vírus podem ser responsáveis pelas variações na resposta clínica. Por um lado, existe a MD aguda, onde o vírus CP compartilha homologia estreita com o vírus NCP em animais PI. Por outro lado, pode ocorrer a seroconversão, onde o vírus CP é heterólogo do vírus NCP. Entre estas duas formas, existem outras formas clínicas tais como a MD crónica e, possivelmente, a MD com recuperação, as quais são determinadas pela relação antigénica entre os vírus NCP e CP. Uma forma tardia da MD já foi descrita por Ridpath e Bolin (1995), a qual

ocorre após o tempo esperado para o aparecimento da Doença das Mucosas aguda, seguida à exposição de um animal PI a um vírus CP exógeno (Radostits *et al.*, 2000; Grooms *et al.*, 2006b). Edwards *et al.* (1991) relataram vários animais PI que apresentavam sinais transitórios da MD seguidos de recuperação, permanecendo saudáveis durante alguns anos após o estudo.

O antigénio viral pode ser encontrado em vários tecidos, tais como linfonodos, placas de Peyer, íleo e tecido linfóide no cólon proximal, tonsilas palatinas, baço, células epiteliais bronquiolares, criptas da mucosa intestinal, glândulas salivares, língua, esófago e pele (Radostits *et al.*, 2000; Liebler-Tenorio, 2005).

No exame *post-mortem*, os animais que morreram de MD apresentam, normalmente, lesões graves, erosivas necrosantes ou ulcerativas, envolvendo a boca, língua, esófago, pilares do rúmen, omaso, abomaso, intestinos e ceco. Estas lesões ulcerativas podem-se estender às narinas e à cavidade nasal, por sua vez as úlceras do esófago são tipicamente alongadas. Observa-se enterite catarral ou hemorrágica, as placas de Peyer estão edematosas, necróticas e hemorrágicas, e os conteúdos intestinais são aquosos, hemorrágicos e fétidos (Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Evermann e Barrington, 2005; OIE, 2008). As lesões da pele são frequentemente observadas, principalmente em animais com MD crónica, e caracterizam-se por hiperqueratose em torno do pescoço, ombro e região perineal. Podem estar presentes lesões erosivas na região perineal, prepúcio, fissura interdigital e faixa coronária do casco (Grooms *et al.*, 2006b).

Histologicamente, observa-se necrose das placas de Peyer, dos centros germinativos do baço e linfonodos; edema, degenerescência balonizante, necrose e infiltrado inflamatório nas mucosas do tracto digestivo (Flores, 2003; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008).

5.4.1. Doença das Mucosas: forma aguda

A ocorrência da MD na sua forma aguda é esporádica, sendo infectado menos de 5% do rebanho. Em casos raros, durante as epizootias podem estar afectados até 25% dos animais da exploração, no entanto seria necessário um grande número de animais PI para que tal ocorresse. A taxa de mortalidade na MD aguda aproxima-se dos 100% (Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b).

Esta forma é caracterizada por um período de incubação de 10-14 dias após a exposição. Os sinais clínicos são: febre bifásica (40-41°C), anorexia, taquicardia, polipneia, redução na produção leiteira, diarreia aquosa profusa (ocasionalmente com sangue vivo, coágulos de fibrina e odor fétido) 2-3 dias após o início dos sinais clínicos, acidose, emaciação, desidratação,

depressão e morte (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007). Podem ocorrer lesões erosivas no epitélio da língua, palato, faringe e superfícies bocais, podendo também estarem presentes no espaço interdigital, tetos e vulva. Estas lesões erosivas podem ser ulcerativas ou diftéricas, dependendo da duração das mesmas. Outros sinais clínicos podem incluir corrimento nasal mucopurulento e ocular, opacidade da córnea, salivação excessiva, redução na ruminação e timpanismo. Os bovinos podem apresentar inflamação do espaço interdigital e faixa coronária e, em alguns casos, laminite (Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005). Os animais com infecção aguda apresentam neutropenia (sem desvio à esquerda) e trombocitopenia. Normalmente, os animais com MD apresentam infecção bacteriana secundária, originando pneumonias, mamites ou metrites. Os bovinos com MD tornam-se progressivamente desidratados e debilitados e geralmente morrem em 3 a 10 dias. Alguns animais sobrevivem à fase aguda mas desenvolvem a forma crónica da doença (Evermann e Barrington, 2005; Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b).

5.4.2. Doença das Mucosas: forma crónica

Alguns bovinos que desenvolvem a MD não morrem no tempo esperado mas tornam-se cronicamente infectados (Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). Na forma crónica, os sinais clínicos são inespecíficos (Flores, 2003). Bovinos com MD crónica não se desenvolvem e podem apresentar constantemente fezes amolecidas ou diarreia intermitente, timpanismo crónico, redução no apetite, perda de peso, apatia progressiva, erosões interdigitais e lesões erosivas crónicas na mucosa oral e na pele não-cicatrizáveis. Estão presentes corrimentos nasais e oculares persistentes. Na pele podem-se desenvolver áreas de alopecia e hiperqueratinização, tipicamente na região do pescoço. Um longo período de claudicação pode aparecer devido a laminite, necrose interdital ou deformação dos cascos (Flores, 2003; Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007). Estes animais podem ter anemia persistente, neutropenia e trombocitopenia (Gondim, 2006; Grooms *et al.*, 2006b). Os bovinos com a forma crónica da MD raramente sobrevivem além dos 18 meses, sendo a morte o resultado da grave debilidade e emaciação (Deregt e Loewen, 1995; Andrews *et al.*, 2004; Evermann e Barrington, 2005).

5.5. Imunossupressão

Existem evidências de que as infecções pós-natais pelo BVDV possam causar imunossupressão e estimular o desenvolvimento de outras doenças infecciosas, e de ser o factor crucial na patogenia das doenças de etiologia múltipla, como pneumonias e enterites. Contudo, esta evidência é controversa e deve ter-se em conta os mecanismos imunes dos bovinos PI, comparados aos animais com infecção primária (Radostits *et al.*, 2000).

A patogenia da imunossupressão envolve vários aspectos do sistema imunológico (Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). O vírus tem uma afinidade por células de defesa e a consequência da infecção é a destruição de algumas destas células e o prejuízo funcional das células sobreviventes. Os linfócitos e macrófagos constituem um importante alvo para a replicação do BVDV (Gondim, 2006). As lesões provocadas pelo BVDV nos animais sugerem imunossupressão, devido à depleção linfóide e neutropenia. Da mesma forma, algumas vacinas vivas modificadas são consideradas imunossupressivas temporariamente em vitelos ou poderão potenciar infecções intercorrentes (Radostits *et al.*, 2000; Evermann e Barrington, 2005; Grooms *et al.*, 2006b).

A infecção aguda com o BVDV também causa uma redução em CD 4+ e CD 8+ de linfócitos T e redução de linfócitos B e de neutrófilos, embora o número absoluto de linfócitos permaneça relativamente normal (Liebler-Tenorio, 2005; Gondim, 2006). Os neutrófilos de bovinos infectados pelo BVDV têm actividade bactericida reduzida (Evermann e Barrington, 2005).

A importância da imunossupressão induzida pelo BVDV deve-se ao facto de aumentar a susceptibilidade do hospedeiro a outros agentes patogénicos e de poder aumentar a patogenicidade de microrganismos co-infectantes (Grooms *et al.*, 2006b). O stresse do hospedeiro no momento da infecção pelo BVDV também irá aumentar a imunossupressão induzida pelo vírus. Os efeitos sinérgicos das infecções pelo BVDV já foram descritos quando os animais estão concorrentemente infectados com *Mannheimia haemolytica*, herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), vírus sincicial respiratório bovino, salmonelose, infecções por *Escherichia coli*, estomatite papular bovina, actinomicose, infecções por coronavírus e rotavírus, babesiose, helmintose aguda, metrite e mastite (Evermann e Barrington, 2005; Gondim, 2006). A imunossupressão induzida pelo BVDV também pode ter como resultado indirecto a produção de prostaglandinas pelas células infectadas (Grooms *et al.*, 2006b).

5.5.1. Patologia Respiratória

A infecção intercorrente pelo BVDV tem o potencial de exacerbar a patogenicidade de outros agentes patogénicos ou mudar o carácter da doença causada por esses agentes. Infecções coexistentes de BVDV e BHV-1 em bovinos resultam em doença clínica grave, afectando o tracto respiratório, tecido ocular e tracto gastrointestinal e, muitas das vezes, a infecção oportunista por *Mannheimia haemolytica* favorece aparentemente a gravidade das lesões no tracto respiratório (Gondim, 2006).

O BVDV foi relacionado ao complexo da Doença Respiratória Bovina desde as suas primeiras descrições (Grooms *et al.*, 2006b), pois nos surtos de doença respiratória nos vitelos e bovinos adultos causados por múltiplas infecções virais, o BVDV é o agente viral mais frequente (Radostits *et al.*, 2000). Assim, o BVDV pode contribuir para a patogenia das doenças do tracto respiratório como agente primário ou através de imunossupressão. O BVDV pode agir sinergicamente com outros agentes patogénicos respiratórios (*M. haemolytica*, Herpesvírus Bovino tipo 1, Vírus Respiratório Sincicial Bovino, parainfluenza-3, coronavírus respiratório bovino, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Hemophilus somnus*) (Evermann e Barrington, 2005; Kapil *et al.*, 2005; Grooms *et al.*, 2006b) para facilitar a colonização bacteriana do tracto respiratório inferior, mas a participação do BVDV em infecções sinérgicas não é frequentemente reconhecida devido à ausência de lesões clássicas da MD (Gondim, 2006). Contudo, também é possível que o vírus possa estar, por coincidência, presente em alguns animais e não ter efeito adverso. Portanto, a presença do vírus nos tecidos do tracto respiratório de bovinos com pneumonia é difícil de interpretar. Observações de campo sugerem que a seguir à introdução da infecção pelo BVDV numa exploração susceptível, poderá haver um aumento da incidência de pneumonias virais e bacterianas nos vitelos, podendo-se manterem durante 2 anos (Radostits *et al.*, 2000).

6. Diagnóstico

A BVD é diagnosticada a partir dos antecedentes, sinais clínicos e lesões macroscópicas e microscópicas. Muitas vezes, para efeitos práticos ou controlo simples, o diagnóstico laboratorial imunológico é apenas necessário quando os sinais clínicos e as lesões macroscópicas são pouco evidentes (Goyal, 2005; Kahn *et al.*, 2007). O tipo de amostras a submeter depende da história clínica e da história da exploração, sendo o historial de vacinações necessário para a interpretação da serologia (Radostits *et al.*, 2000). Para a confirmação do diagnóstico, pode-se enviar para o laboratório colheitas de sangue com anticoagulante, soro, órgãos (baço, timo,

intestino e linfonodos), fetos, placentas e placentomas, para além de órgãos e tecidos com lesões macroscópicas (Flores, 2003). A maioria dos métodos para o diagnóstico virológico está comprometida pela interferência dos anticorpos maternos, sendo que os animais PI não são correctamente identificados até que a imunidade colostrar tenha diminuído (Lindberg *et al.*, 2006).

6.1. Isolamento do vírus

O isolamento do vírus é o método mais fidedigno e amplamente utilizado para o diagnóstico de infecções por BVDV (Radostits *et al.*, 2000), permitindo também a caracterização do agente, principalmente nos aspectos antigénico e genotípico, que são de especial interesse epidemiológico (Flores *et al.*, 2005).

O BVDV é isolado por inoculação apropriada de amostras em culturas celulares (Grooms *et al.*, 2006b). As estirpes podem ser caracterizadas como biótipos CP ou NCP, pela presença ou ausência de efeitos citopatogénicos característicos evidentes em culturas celulares inoculadas há 48 horas. As estirpes NCP são identificadas em culturas celulares através de imunoenzimas ou imunofluorescência (Deregt e Loewen, 1995; Flores, 2003; Gondim, 2006; OIE, 2008). A reacção da monocamada de imunoperoxidase é uma forma comum do isolamento viral e da detecção imunoenzimática do antígeno, sendo usada para uma rápida triagem do BVDV (Grooms *et al.*, 2006b). A técnica de imunoperoxidase indirecta é recomendada para a certificação do sêmen bovino para inseminação artificial quando o teste de imunofluorescência não está disponível (Radostits *et al.*, 2000).

Durante a fase de virémia, o vírus pode ser isolado a partir de descargas nasais, pulmão ou fezes. No entanto, sêmen, sangue, soro, fetos e fezes podem ser utilizados para isolamento do vírus (Goyal, 2005).

O soro é a amostra mais usada para isolar o vírus de bovinos PI, enquanto a capa leucocitária ou *swabs* nasais são mais apropriados para tentativas de detecção de infecções agudas (Andrews *et al.*, 2004; Grooms *et al.*, 2006b). Por sua vez, as células do *buffy coat*, sangue total, leucócitos ou soro são adequados para o isolamento do BVDV a partir de animais vivos (OIE, 2008). A presença de anticorpos anti-BVDV pode interferir com o isolamento do vírus a partir de amostras de soro ou *buffy coat* (Goyal, 2005), bem como os anticorpos maternos presentes no soro de vitelos podem interferir com o isolamento do agente (OIE, 2008). No exame *ante-mortem*, para se diferenciar animais PI de animais portadores de infecção aguda é necessário o isolamento em série do vírus, pelo menos com duas semanas de intervalo (Grooms

et al., 2006b). À necropsia, o BVDV é mais facilmente isolado em tecidos linfóides, tais como placas de Peyer, linfonodos, timo e baço, e em segmentos ulcerados do tracto gastrointestinal (Kahn *et al.*, 2007).

O vírus isolado pode ser confirmado pelo DFA (*direct fluorescent antibody assay*), imunoperoxidase, ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) por captura de antigénio, ou RT-PCR (*reverse transcriptase polimerase chain reaction*) (Goyal, 2005).

6.2. Detecção antigénica

O vírus pode ser identificado em amostras de tecidos através de imunohistoquímica (IHC), tais como imunofluorescência ou imunoenzimas (Flores, 2003; OIE, 2008). Através destes métodos, a identificação do antigénio em tecidos previamente fixados poderá ser utilizada como confirmação laboratorial da infecção pelo BVDV sem haver isolamento positivo do vírus (Radostits *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2007). A coloração imunohistoquímica de tecidos fixados em formalina ou embebidos em parafina é considerada uma técnica eficiente para a detecção do BVDV e muitas vezes considerada como sendo melhor que a histopatologia (Goyal, 2005).

Para a identificação de animais PI quase todos os tecidos podem ser utilizados, mas é mais eficaz em amostras de linfonodos, tiróide, pele, cérebro, abomaso e placenta (Goyal, 2005; OIE, 2008). A pele dos animais PI é um dos tecidos na qual o BVDV pode ser identificado por IHC, principalmente em biopsias de orelha (Flores, 2003; OIE, 2008). Pelo contrário, animais com infecção aguda não possuem quantidades significativas de antigénio no tecido subcutâneo (Gondim, 2006). A IHC é também uma técnica capaz de testar bovinos jovens sem a interferência de anticorpos colostrais (Goyal, 2005).

O anticorpo monoclonal usado para IHC deve ser escolhido com precaução, pois apenas um dos 32 anticorpos monoclonais contra proteínas e glicoproteínas do vírus é capaz de detectar o BVDV em tecidos fixados com formalina. Assim, este anticorpo monoclonal (designado por 15C5) é amplamente utilizado para detectar o antigénio viral por IHC (Goyal, 2005).

O antigénio viral pode ser também identificado em amostras de sangue através da técnica ELISA, por capturadores de antigénios monoclonais dirigidos contra um domínio antigénico conservado da proteína não estrutural NS2/3. Esta técnica é muito sensível para a detecção de bovinos PI e isolamento do vírus, mas menos sensível para a identificação de infecções agudas com o BVDV pois o vírus permanece no sangue num curto espaço de tempo (Flores, 2003; Goyal, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). Esta técnica permite detectar, rapidamente e com exactidão, antigénios específicos em leucócitos de sangue periférico, coágulos sanguíneos e amostras de

tecido de animais PI (Radostits *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2007). Também já foi utilizada para detectar o antigénio vírico no sistema nervoso central de animais PI (Gondim, 2006).

6.2.1. Detecção dos ácidos nucleicos

Este método laboratorial envolve a detecção directa dos ácidos nucleicos do RNA do genoma vírico. Tem como vantagens a ausência de potenciais interferências com anticorpos neutralizantes, bem como a sua sensibilidade e especificidade (Radostits *et al.*, 2000).

6.2.2. Polimerase Chain Reaction

A técnica de *polimerase chain reaction* (PCR) é capaz de detectar pequenas porções de ácidos nucleicos virais de amostras sanguíneas e de tecidos, incluindo material conservado (Radostits *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2007). O PCR é um método muito sensível (Larson, 2005; Gondim, 2006), mas é sujeito a falsos positivos pois não diferencia ácidos nucleicos de vírus vivos ou inactivados, bem como devido à contaminação de amostras durante a colheita ou no laboratório (Goyal, 2005).

O método *reverse transcriptase polimerase chain reaction* (RT-PCR) pode ser adaptado para a detecção de BVD através do RNA viral (OIE, 2008), em soro, células do *buffy coat* e em tecidos frescos e fixados em formalina, incluindo biopsia de orelha (Goyal, 2005). Esta técnica é baseada na detecção da região 5' não traduzida (5' UTR) e do gene E2 do BVDV (Goyal, 2005). No entanto, é necessária atenção na interpretação dos resultados, pois a detecção de RNA viral não implica só por si a presença do vírus (OIE, 2008).

A detecção do vírus por RT-PCR é mais rápida e sensível do que o isolamento do vírus. Para além disto e ao contrário do isolamento do vírus, o RT-PCR não é afectado pela presença de anticorpos em amostras de soro (Goyal, 2005).

Devido à sua alta sensibilidade, o RT-PCR é considerado um método alternativo aos métodos de uso comum para a detecção do BVDV, especialmente em *pools* de amostras como em tanques leiteiros (Goyal, 2005). Assim, a técnica RT-PCR é suficientemente sensível para detectar vacas PI em lactação num rebanho de 100 ou mais animais, através do exame às células somáticas no leite (Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003). O resultado positivo indica que existe pelo menos um animal PI no rebanho. Para o identificar deve-se efectuar de seguida o isolamento do vírus ou testes de detecção antigénica (OIE, 2008).

Os ácidos nucleicos virais também podem ser detectados em tecidos frescos ou fixados por hibridação *in situ*. A diferenciação dos genótipos virais é realizada normalmente por PCR ou

PCR seguida de sequenciação do ácido nucleico, apesar de ser também possível através de ensaios com anticorpos monoclonais e hibridação do ácido nucleico (Larson, 2005; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008).

6.3. Avaliação serológica

As técnicas serológicas são utilizadas para detectar e medir anticorpos. A seroneutralização (SN) é o teste padrão para determinar a ocorrência de títulos de anti-BVDV (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Flores, 2003; Goyal, 2005). O título de anticorpos pode variar muito entre laboratórios, conforme a estirpe do vírus e as células utilizadas no teste (Grooms *et al.*, 2006b).

Após infecção aguda, o anticorpo sérico é detectável às 2-3 semanas e os níveis máximos de anticorpos ocorrem 8 a 10 semanas mais tarde. Após a vacinação, os títulos seroneutralizantes ficam altos durante muitos meses (Radostits *et al.*, 2000), sendo que titulações de amostras únicas são difíceis de interpretar nestas situações (Grooms *et al.*, 2006b).

A identificação da seropositividade de um animal indica apenas a exposição prévia ao agente (Flores, 2003). Nestes casos, a serologia pareada, ou seja, a colheita de soro no momento da suspeita clínica e uma segunda colheita após 15 a 20 dias pode indicar a infecção pelo vírus. A elevação dos títulos de anticorpos em, pelo menos, 4 vezes indica, ainda que de forma indirecta, que o animal estava infectado pelo vírus no momento da primeira colheita. A serologia com amostras únicas, não pareadas, possui valor diagnóstico limitado, pois apenas indica que houve exposição prévia (Flores, 2003; Kahn *et al.*, 2007). Os animais PI são seronegativos, excepto se tiverem anticorpos colostrais nas primeiras semanas de vida. Geralmente, os anticorpos não são detectáveis no soro na maioria dos animais com Doença das Mucosas. No entanto, os animais PI expostos a outras estirpes de vírus citopatogénico antigenicamente distinto e que não induz imediatamente a MD, ou expostos a vacinação, podem produzir anticorpos seroneutralizantes altamente específicos (Radostits *et al.*, 2000; Flores 2003; Grooms *et al.*, 2006b). Como consequência, a identificação serológica dos bovinos PI não pode ser usada como único critério para determinar o estado PI (Larson, 2005).

A avaliação serológica pode ser útil na determinação do estado de infecção do rebanho. Por exemplo, o alto título de seroneutralização em novilhas não vacinadas, com mais de 6 meses de idade, indica que o BVDV está ou esteve recentemente presente na exploração e está altamente relacionada com a presença de bovinos PI nessa exploração (Grooms *et al.*, 2006b).

Contudo, a técnica *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) também é útil para quantificar os anticorpos séricos e é uma alternativa rápida e económica aos testes de SN (Gondim, 2006). Apenas uma diluição do soro pode ser utilizada para quantificar os anticorpos (Goyal, 2005). Este método tem sido utilizado em amostras de leite para quantificar a prevalência de vacas positivas ao anticorpo anti-BVDV em rebanhos leiteiros (Radostits *et al.*, 2000). Os kits comerciais são comuns na detecção de animais PI, mas não são fiáveis no diagnóstico de infecção aguda por BVDV (Gondim, 2006). Os antígenos usados em testes ELISA incluem todos os antígenos virais, proteínas não-estruturais, anticorpos monoclonais e peptídeos. O procedimento utilizado na preparação dos antígenos virais pode afectar a especificidade e a sensibilidade do teste. A especificidade deste serodiagnóstico tem sido aumentada pelo uso de anticorpos monoclonais em sistemas de ELISA de competição e novas melhorias são possíveis com a utilização de antígenos bem definidos derivados de técnicas de DNA recombinante (Goyal, 2005).

6.4. Aplicação das técnicas laboratoriais na exploração

Devido à natureza complexa das infecções do BVDV, é difícil obter um diagnóstico etiológico definitivo (Radostits *et al.*, 2000).

6.4.1. Infecções agudas

O diagnóstico de infecções agudas deve ser feito entre os 3 e os 10 dias após infecção. Alguns animais apenas são positivos ao isolamento viral durante 2 ou três dias de infecção. As amostras de sangue total são as melhores para isolar o vírus para identificar animais com infecção aguda, podendo-se também efectuar *swabs* nasais. Em surtos agudos nas explorações leiteiras, deve recolher-se também amostras de sangue de animais clinicamente saudáveis. Para serologia, deve recolher-se amostras pareadas, de modo a identificar o aumento dos títulos de anticorpos no soro (Radostits *et al.*, 2000; BVDV: Control & Prevention, 2005;).

No exame *post-mortem*, as amostras colhidas de órgãos linfóides provenientes de animais mortos ou de fetos abortados devem ser submetidos a isolamento do vírus. Alguns fetos abortados poderão ser serologicamente positivos, o que confirma a infecção intra-uterina na parte final da vida fetal (Radostits *et al.*, 2000; BVDV: Control & Prevention, 2005).

Os vitelos infectados nascidos com defeitos congénitos apresentam anticorpos, por isso o diagnóstico do BVDV nestes animais deve incluir o isolamento do vírus e serologia para detectar os anticorpos específicos ao BVDV antes da ingestão de colostro (Radostits *et al.*, 2000; BVDV:

Control & Prevention, 2005). Os anticorpos específicos podem ser detectados em amostras de fluidos fetais ou soro, bem como no fluido supranadante de tecidos em suspensão. Os nados-mortos e os efeitos teratogénicos podem estar relacionados com a resposta imune activa do feto. Por sua vez, a fêmea tem altos títulos de anticorpos ($>1/2000$) para o BVDV, sugestivo de infecção fetal (OIE, 2008).

6.4.2. Infecções persistentes

A identificação de animais PI é feita, normalmente, através do isolamento do vírus a partir de amostras sanguíneas sequenciais, colhidas ao longo de 30 dias. Na maioria dos casos, o soro é adequado para o isolamento do vírus (Radostits *et al.*, 2000; BVDV: Control & Prevention, 2005).

O vírus também pode ser identificado na pele através de IHC (OIE, 2008), sendo a coloração imunohistoquímica de biopsias de orelhas considerada um método efectivo para detectar animais PI, por serem facilmente obtidas e relativamente estáveis (Goyal, 2005). Para além disto, esta técnica não é afectada pela presença de anticorpos maternos (Goyal, 2005).

Em vitelos com menos de 3 meses de idade, os anticorpos colostrais diminuem o nível de vírus livre no soro, podendo provocar falsos negativos. Por esta razão, é recomendado nestes animais o uso de amostras de sangue total em que se pode efectuar o isolamento do vírus a partir do *buffy coat* (Radostits *et al.*, 2000; BVDV: Control & Prevention, 2005).

A maioria dos animais PI são seronegativos depois da imunidade colostrar diminuir, mas podem desenvolver anticorpos seroneutralizantes para estirpes heterólogas do vírus, incluindo vacinas (Deregt e Loewen, 1995). Para confirmar o diagnóstico de infecção persistente, os animais deverão ser testados depois de um intervalo de pelo menos 3 semanas, apenas quando se utiliza o método de amostras pareadas (Goyal, 2005; OIE, 2008).

6.4.3. Doença das Mucosas

A confirmação do diagnóstico de MD deve incluir o isolamento do vírus NCP dos animais afectados. Por vezes, este biótipo pode ser isolado a partir do sangue ou órgão hematopoiéticos, apesar de ser isolado com mais garantia a partir de outros tecidos, tais como tecido intestinal, placas de Peyer e baço. Na MD, pode-se efectuar a coloração do antigénio viral por imunofluorescência ou imunoperoxidase, a partir de secções de tecido obtidas em crióstato (OIE, 2008).

7. Diagnóstico diferencial

O BVDV deve ser diferenciado de etiologias que causam diarreia, erosões e/ou ulcerações no tracto gastrointestinal, falhas reprodutivas, efeitos teratogénicos, patologias cutâneas, subdesenvolvimento e patologias respiratórias. Estas etiologias incluem vários agentes infecciosos, parasitas e toxinas (Gondim, 2006).

O diagnóstico diferencial para doenças causadoras de diarreia nos animais adultos inclui salmonelose, disenteria de inverno, doença de Johne, parasitismo gastrointestinal, febre catarral maligna, intoxicação por arsénio, micotoxicoses e deficiência em cobre. Por sua vez, o diagnóstico diferencial para doenças que causam lesões orais nos animais inclui a febre catarral maligna, língua azul, estomatite vesicular, estomatite papular, febre aftosa e peste bovina (Goyal, 2006).

O diagnóstico diferencial da doença bovina com lesões orais e diarreia incluem a infecção aguda grave da BVD, peste bovina, febre catarral maligna bovina e doença das mucosas. As doenças caracterizadas por lesões orais e que não apresentam diarreia são a febre aftosa, estomatite vesicular e estomatite papular bovina. As doenças que provocam diarreia mas que não apresentam lesões orais são a disenteria de inverno, salmonelose, doença de Johne, parasitismos e deficiência em cobre (Grooms *et al.*, 2006b).

O diagnóstico diferencial da infecção aguda do BVDV durante o período neonatal inclui outras causas de diarreia em bovinos jovens, como infecções por rotavírus ou coronavírus, criptosporidiose, infecção por *Escherichia coli*, salmonelose e coccidiose. Outras causas de doenças respiratórias em vitelos também devem ser consideradas, tais como infecção com o BRSV, *Pasteurella* spp., *Mannheimia* spp., *Hemophilus* spp., *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp. (Goyal, 2006; Grooms *et al.*, 2006b).

Os casos de doença das mucosas necessitam de diagnóstico diferencial especialmente da febre aftosa, visto que fazem parte do complexo de doenças vesiculares e erosivas. Por seu turno, o diagnóstico diferencial da forma trombocitopénica da infecção aguda pós-natal efectua-se em relação a outras patologias hemorrágicas, como a intoxicação aguda por *Pteridium aquilinum* (Flores, 2003).

8. Prognóstico e Tratamento

No início do surto o prognóstico é reservado, pois não é possível avaliar a morbilidade, e quando existem lesões das mucosas e desidratação é desfavorável, pois a evolução é rápida e causa alta mortalidade (Gondim, 2006). Assim, o prognóstico em casos graves com diarreia

aquosa profusa e lesões orais é desfavorável, podendo ser ponderado o abate do animal. Os animais com BVD crónica devem ser refugados e destruídos (Radostits *et al.*, 2000).

Nenhum tratamento específico está disponível para animais que apresentem sinais clínicos da infecção com o BVDV (Radostits *et al.*, 2000). Os proprietários devem ser informados que os animais gravemente doentes podem apresentar doença das mucosas, o que é normalmente fatal. Os objectivos do tratamento em bovinos suspeitos de infecção aguda são de apoio e prevenção de infecção bacteriana secundária (Grooms *et al.*, 2006b). São indicados agentes antimicrobianos de largo espectro, fluidoterapia, electrólitos suplementares e vitaminas (Kahn *et al.*, 2007). Aos bovinos com evidências clínicas de hemorragia devido à trombocitopenia podem-se efectuar transfusões de sangue total fresco, não devendo submeter estes animais a procedimentos cirúrgicos; deve, também, controlar-se a população de insectos para evitar lesões múltiplas que possam originar hemorragia (Gondim, 2006).

9. Profilaxia e Controlo

O sucesso do controlo e prevenção do complexo BVD/MD depende da implementação de programas de saúde adoptados para evitar a introdução de infecção na exploração, identificação e eliminação de animais PI e vacinação de animais reprodutores (Radostits *et al.*, 2000; Brock, 2004; Kelling, 2004; Grooms, 2006a; Kahn *et al.*, 2007). Por ser ubiqüitário, o controlo do BVDV pode efectuar-se tanto a nível do rebanho como a nível nacional (OIE, 2008).

Remoção de animais PI: a detecção e eliminação de animais PI são componentes essenciais do programa de controlo em explorações infectadas. A eliminação destes animais irá diminuir a disseminação do agente e melhorar a saúde do rebanho. Uma das estratégias mais comuns para identificar animais PI é a colheita de amostras de soro de todos os animais do rebanho com idades superiores a 3 meses para isolamento do vírus através da técnica de imunoperoxidase. Os resultados estão geralmente disponíveis entre 5 a 9 dias depois. Todos os vitelos nascidos nos 9 a 12 meses após o exame devem ser testados, de modo a controlar o nascimento de animais PI infectados *in utero* no momento do exame das progenitoras. Devido à interferência dos anticorpos maternos, os vitelos devem ser reexaminados 3 a 4 meses antes da vacinação, para assegurar que nenhum animal PI é colocado no grupo dos reprodutores (Radostits *et al.*, 2000). Todos os animais PI devem ser eliminados (Kahn *et al.*, 2007).

Biossegurança: boas práticas de biossegurança são essenciais para o controlo e prevenção da BVD. A introdução ou adição de animais, especialmente fêmeas prenhes, são a forma mais comum para que o vírus se introduza em explorações de leite ou carne. A compra de novilhas,

vacas ou touros apresentam menor risco de introdução do BVDV na exploração quando estes animais são testados de forma a assegurar que não estão persistentemente infectados, e quando permanecem de quarentena por 30 dias antes da sua introdução na exploração (Brock, 2004; BVDV: Control & Prevention, 2005; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008). O período de quarentena deve ser a base de todos os procedimentos de biossegurança, prevenindo a entrada de infecções transitórias (agudas). Se forem compradas fêmeas prenhes, o feto deverá ser tratado como um novo elemento a adicionar. Assim, antes de serem introduzidos no rebanho, a fêmea gestante deve ser examinada para verificar o estado negativo de infecção persistente e o vitelo deve ser testado ao nascimento para assegurar que não é PI (Brock, 2004; BVDV: Control & Prevention, 2005; Larson, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Smith *et al.*, 2009).

Por sua vez, o contacto do rebanho com outros animais cujo estado do teste de despiste do BVDV é desconhecido (infecção persistente) deve ser prevenido (Brock, 2004; BVDV: Control & Prevention, 2005). Deste modo, diminuindo o contacto de rebanhos vizinhos através de cercas ou de pastagens comuns, diminui-se também o risco de infecção pelo BVDV. Outros métodos de transmissão do BVDV, tais como fomites, transferências embrionárias, inseminação artificial e animais selvagens, devem ser considerados como fontes potenciais de introdução do vírus na exploração (Sandvik, 2004; BVDV: Control & Prevention, 2005; Smith *et al.*, 2009).

Um dos objectivos primários do controlo da BVD deve ser a prevenção da persistência do vírus na exploração. Ao evitar a exposição de animais gestantes ao BVDV nos primeiros 5 meses de gestação irá quebrar-se o ciclo da persistência, bem como irá prevenir-se a permanência e/ou desenvolvimento de infecções persistentes (BVDV: Control & Prevention, 2005). Por exemplo, nos rebanhos de bovinos de carne, os vitelos em amamentação estão, geralmente, em contacto com as progenitoras durante a primeira metade da gestação seguinte, fornecendo tempo e oportunidade de exposição da infecção persistente às fêmeas reprodutoras durante os primeiros 125 dias de gestação, altura crítica quando o feto é susceptível à infecção persistente do BVDV. O mesmo não acontece nas vacarias de leite, onde os vitelos recém-nascidos são imediatamente separados das progenitoras (Kelling *et al.*, 2000 citado por Brock, 2004; Wittum *et al.*, 2001; Smith e Grotelueschen, 2004). Assim, a identificação e remoção de animais PI, bem como o isolamento de fêmeas prenhes de animais portadores de infecção aguda são factores vitais para prevenir a exposição (BVDV: Control & Prevention, 2005).

Vacinação: a vacinação é utilizada para reduzir o risco de perdas quando o manejo preventivo está comprometido (BVDV: Control & Prevention, 2005). Uma estratégia importante para o controlo da doença é a vacinação de fêmeas gestantes semanas antes do parto,

estimulando a imunidade materna a fornecer protecção ao vitelo por imunidade passiva, especialmente nos dois primeiros trimestres, correspondendo ao período em que o feto está mais susceptível aos efeitos do vírus. A vacinação de animais imunocompetentes que não têm infecções virais persistentes deve fornecer protecção parcial ou total contra infecções fetais, abortos, nados-mortos, atraso no crescimento intrauterino, defeitos congénitos e infecções persistentes nos animais acabados de nascer. A protecção contra a infecção fetal varia, aproximadamente, entre 60% a 100% (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Fulton, 2005; Grooms *et al.*, 2006b).

Outro objectivo de um programa vacinal é assegurar que todas as fêmeas gestantes possuam anticorpos para o vírus antes de ficarem prenhes. A vacinação deverá ser efectuada pelo menos 3 semanas antes da concepção, de modo a ficarem seropositivas para o BVDV (Deregt e Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Grooms *et al.*, 2006b).

9.1. Vacinas

A vacinação contra o BVDV tem sido utilizada com relativo sucesso para proteger animais da doença clínica, reduzir a circulação do vírus e para tentar impedir a infecção fetal e a consequente produção de vitelos PI (Flores *et al.*, 2005). Contudo, existem dúvidas se as vacinas existentes e os protocolos vacinais serão aptos para prevenir totalmente as infecções transplacentárias (Lindberg *et al.*, 2006).

A selecção da vacina a utilizar em cada sistema de produção efectua-se de acordo com as seguintes variáveis: resposta imunitária; reactividade cruzada; protecção fetal; duração da imunidade; imunossupressão; reversão da virulência; efeito dos anticorpos maternos na resposta imune; e grau de pureza (Kelling, 2004).

Estão disponíveis no mercado vacinas contendo vírus vivo modificado ou com vírus inactivado. As vacinas vivas modificadas geralmente contêm estirpes CP do vírus atenuado. Muitas das vacinas inactivas possuem tanto estirpes CP como NCP do BVDV (Radostits *et al.*, 2000). Devido à diversidade genética do BVDV, é recomendada a utilização de vacinas multivalentes, contendo pelo menos duas estirpes antigenicamente diferentes (BVDV: Control & Prevention, 2005; Kahn *et al.*, 2007), pois as vacinas produzidas com estirpes do tipo 1, apesar de fornecerem protecção cruzada contra estirpes de BVDV tipos 1 e 2 NCP (Brock *et al.*, 2006), geralmente, apenas induzem protecção parcial ou incompleta contra estirpes de BVDV-2 (Flores, 2003; Gondim, 2006). Contudo, a Europa está dividida quanto ao uso das vacinas contra o BVDV. Para alguns países, como a Finlândia e os países escandinavos, não estão disponíveis

vacinas no mercado e o seu uso é proibido. Noutros países, como Portugal, Espanha, França e Alemanha, existem várias vacinas disponíveis no mercado, tanto vivas modificadas como inactivadas. No Reino Unido e Irlanda, apenas as vacinas inactivadas estão licenciadas para utilização (Moennig e Brownlie, 2006).

Deve-se seguir sempre as recomendações do fabricante (Kelling, 2004).

9.1.1. Vacinas vivas modificadas

As vacinas vivas modificadas são atenuadas, pelo que a replicação do vírus é reduzida, diminuindo assim a virulência e a eliminação do vírus da vacina pelo animal vacinado (Radostits *et al.*, 2000).

Uma das vantagens deste tipo de vacinas é devida ao antigénio ser amplificado por replicação no animal, pois será apenas necessário um número pequeno de partículas virais, tornando-se uma vacina económica, necessitando apenas de uma dose para uma imunização adequada. A duração da imunidade também constitui uma vantagem para este tipo de vacinas, pois tendem a induzir uma resposta imunitária mais forte. Pelo contrário, as vacinas vivas modificadas têm como desvantagens a falha na imunização, se a vacina for armazenada ou manipulada incorrectamente, bem como poderá causar a doença, se o vírus recuperar a virulência. Outra desvantagem é a sua susceptibilidade para a inactivação através de produtos químicos e/ou exposição a altas temperaturas (Radostits *et al.*, 2000; Kelling, 2004; Fulton, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; OIE, 2008).

Por sua vez, no processo de produção das vacinas vivas modificadas é utilizado como suplemento para crescimento de culturas celulares o soro fetal bovino proveniente de diferentes partes do mundo, aumentando o risco de serem contaminadas com estirpes NCP (é um contaminante frequente do soro fetal bovino) e, deste modo, permitirem a introdução de estirpes exóticas na Europa (Brock, 2003; Fulton, 2005; Lindberg *et al.*, 2006; Moennig e Brownlie, 2006). As vacinas vivas modificadas contaminadas com o genótipo BVDV-2 têm o potencial de gerarem surtos da doença quando inoculadas em animais susceptíveis (Falcone *et al.*, 2003). Assim, quando as vacinas são utilizadas num esquema de controlo sistemático, tem que ser mantido um alto nível de higiene (Lindberg *et al.*, 2006).

As vacinas vivas modificadas são potencialmente patogénicas para o feto e não deverão ser administradas em vacas gestantes. Os efeitos possíveis são variáveis e dependem do período de gestação em que a vacinação ocorre. Este tipo de vacinas induz a supressões prolongadas dos mecanismos de defesa do hospedeiro (funções neutrofílicas e linfocíticas), pelo que a

imunossupressão e recombinação genética são outros riscos associados às vacinas vivas modificadas (Roth e Kaberle, 1983 citado por Fulton, 2005; Radostits *et al.*, 2000; Kelling, 2004; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007; OIE, 2008).

Os anticorpos anti-BVDV presentes no colostro conseguem neutralizar o BVDV da vacina viva modificada, bloqueando a indução da resposta imune protectora (Ellis *et al.*, 2001 citado por Thurmond, 2005; Kelling, 2004).

Em Portugal apenas se comercializa uma vacina contendo vírus vivo modificado de BVD, IBR, BRSV e PI-3. Trata-se da Pyramid 4[®] comercializada pela Farmoquil – Sociedade Farmoquímica, Lda (APIFARMA e CESA, 2007).

9.1.2. Vacinas inactivadas

As desvantagens das vacinas vivas modificadas estimulam o desenvolvimento de vacinas inactivadas (Radostits *et al.*, 2000).

As vantagens das vacinas inactivadas incluem a falta de infecciosidade, presença improvável de agentes adventícios, ausência de doença pós-vacinal, bem como a utilização segura em vacas gestantes. Porém, os altos custos da vacina, a indução de uma resposta dos anticorpos neutralizantes mais fraca e a duração da protecção mais curta, havendo necessidade de duas primovacinações com intervalos de 3 a 4 semanas para alcançar a imunização primária, constituem as suas desvantagens (Radostits *et al.*, 2000; Kelling, 2004; Fulton, 2005; Grooms *et al.*, 2006b; Kahn *et al.*, 2007).

Com a utilização deste tipo de vacinas, podem ocorrer reacções adversas no local de administração e, normalmente, está associado ao adjuvante presente na vacina (Radostits *et al.*, 2000). Os anticorpos maternos podem interferir com a vacina inactivada e os vitelos devem ser revacinados periodicamente a partir dos 6 meses de idade até antes de se reproduzirem (Grooms *et al.*, 2006b).

As vacinas inactivadas são geralmente seguras em fêmeas gestantes, pelo que alguns programas vacinais sugerem este tipo de vacinas durante a gestação (Fulton, 2005).

Em Portugal existem vacinas inactivadas monovalentes para a BVD, tais como Bovilis BVD[®] (Intervet Schering-Plough Portugal – Saúde Animal, Lda), Mucobovin[®] (Merial Portuguesa – Saúde Animal, Lda) e PregSure BVD[®] (Laboratórios Pfizer, Lda). Também estão presentes no mercado português vacinas inactivadas associadas: Hiprabovis-4[®] (Arbuset), Rispoval 4[®] (Laboratórios Pfizer, Lda.), Triangle 4+Ph-K[®] e Triangle 9[®] (Farmoquil – Sociedade Farmo-química, Lda.) (APIFARMA e CESA, 2007).

9.1.3. O futuro: vacinas marcadas

As vacinas marcadas têm como principal vantagem a distinção dos animais imunizados em relação aos animais infectados com o vírus de campo, quando se utilizam os testes serológicos apropriados. Assim, este tipo de vacinas é útil, por exemplo, em vacinações de emergência após um surto, reduzindo a necessidade de abater animais no perímetro do surto (Moennig e Brownlie, 2006).

Apesar das vacinas marcadas serem mais caras que as preparações convencionais, poderão ser consideradas como um bem valioso em programas de controlo sistemático. Assim, as vacinas marcadas podem ser vantajosas em programas de erradicação regionais e nacionais, fornecendo uma melhor protecção fetal e uma diferenciação adequada entre os animais vacinados e os infectados no diagnóstico laboratorial, sendo úteis para monitorizar o progresso do programa (Moennig e Brownlie, 2006).

O desenvolvimento das vacinas marcadas contra o BVD deverá ter em atenção o suficiente desenvolvimento da protecção fetal, de modo a obter o seu real valor comercial e no campo (Moennig e Brownlie, 2006).

9.2. Programas de controlo para limitar as perdas devidas ao BVDV

O primeiro pré-requisito para planear um programa de controlo (ou de erradicação) para a BVD é o conhecimento da situação epidemiológica (seroprevalência) da região. Os programas de erradicação só são aplicáveis em regiões onde a vacinação não é prática comum, principalmente em áreas de baixa densidade de animais (Greiser-Wilke *et al.*, 2003). Pelo contrário, nas áreas de grande densidade e alta prevalência, 4 princípios do controlo do BVDV têm que ser aplicados ao mesmo tempo e de forma meticulosa para um programa de controlo adequado: biossegurança rigorosa, eliminação de animais PI, e monitorização permanente são indispensáveis, enquanto a vacinação é recomendada como ferramenta suplementar para reforçar a protecção contra reinfecções (Laureyns *et al.*, 2009). Em ambos os casos, apenas são aplicáveis os programas de controlo que visam minimizar as perdas económicas através da diminuição do número de animais PI, e as técnicas de diagnóstico económicas e eficientes para a vigilância a nível do rebanho são o segundo pré-requisito indispensável. A probabilidade de sucesso do programa de controlo ou erradicação será aumentada se os métodos de diagnóstico, especialmente os de detecção de anticorpos, estiverem estandardizados entre os laboratórios envolvidos (Greiser-Wilke *et al.*, 2003). Lindberg *et al.* (2006) sugerem a criação de um laboratório europeu de

referência para a BVD, sendo da sua responsabilidade a preparação de *kits* estandardizados disponíveis para utilização em laboratórios de diagnóstico.

9.2.1. Bovinos leiteiros

Nestes rebanhos, os vitelos são separados das suas mães logo a seguir ao nascimento, não estando em contacto com o grupo de reprodutoras durante a gestação (Smith e Grotelueschen, 2004; Larson, 2005). Por isso, o risco de transmissão do BVDV dos vitelos para as fêmeas gestantes é eliminado ou reduzido, em comparação com os rebanhos de bovinos de carne. Contudo, devido à substituição das fêmeas gestantes ser efectuada através de compra ou por criação noutra secção da vacaria, o risco da introdução de animais PI para reposição ou de animais gestantes não PI com feto PI é maior nas vacarias de leite do que em rebanhos de bovinos de carne. A biossegurança das vacarias de leite deve incluir o acompanhamento e examinação de potenciais novilhas de reposição antes da sua primeira época de cobrição, bem como de novilhas e de vacas adultas durante a gestação de modo a prevenir a exposição a animais PI ou com infecção transitória, e um programa vacinal para fornecer algum nível de protecção contra a exposição a possíveis animais virémicos (Larson, 2005).

Se as novilhas de reposição saudáveis estiverem isoladas das fêmeas gestantes, devem ser vacinadas duas vezes antes de serem beneficiadas. A vacinação deve ser programada para que a protecção seja máxima durante os primeiros 4 meses críticos de gestação, maximizando o potencial da duração da imunidade adequada. As vacinas vivas modificadas devem ser administradas 60 dias antes da reprodução, enquanto a segunda dose deve ser administrada 2 semanas antes (Kelling, 2004).

Por sua vez, se houver vacinação de vacas gestantes no último mês de gestação com vacinas inactivadas, irá melhorar a quantidade de anticorpos antivirais no colostro. A vacinação durante a gestação com vacinas vivas modificadas também irá aumentar a quantidade de anticorpos no colostro, apesar deste tipo de vacinação ser apenas aconselhado quando a fêmea já possui anticorpos pré-existentes, pois estas vacinas têm potencial fetopático (Kapil *et al.*, 2005).

As vacas devem ser revacinadas anualmente, 2 semanas antes da reprodução. Já os vitelos recém-nascidos devem ser vacinados o mais brevemente possível, para que estejam protegidos quando os níveis de anticorpos maternos diminuem, pois existe grande percentagem de vitelos recém-nascidos com deficiência na transferência de imunoglobulinas (Kelling, 2004).

9.2.2. Bovinos de carne

Os principais objectivos do controlo do BVDV em explorações de carne são a prevenção de infecções fetais, de modo a eliminar as perdas reprodutivas associadas ao BVDV (e, assim, prevenir o nascimento de vitelos PI), e a redução de perdas devidas a infecções transitórias provocadas pelo vírus (Harkness, 1987 citado por Larson, 2005). Os animais que foram infectados com o BVDV depois de nascerem e recuperaram são considerados protegidos da doença clínica após a exposição ao vírus, mesmo que estes animais sejam seronegativos (Ridpath *et al.*, 2003 citado por Larson, 2005). Os animais que são seropositivos na resposta à exposição natural são também considerados protegidos de futuras transmissões do vírus ao feto. Fêmeas imunocompetentes que pariram animais PI desenvolvem altos títulos de anticorpos provavelmente para eliminar futuras infecções e para os transferir ao feto. Assim, vacas imunocompetentes (não PI) podem ter, pelo menos, um vitelo PI (Larson, 2005).

Mesmo que a vacinação forneça alguma protecção a infecções fetais, a protecção a nível do rebanho não é igual àquela originada por exposição natural. Como resultado, o controlo do BVDV é normalmente efectuado pela combinação da remoção de animais PI, vacinação e um sistema de biossegurança que previne a introdução de animais PI na exploração e minimiza o contacto com animais potencialmente virémicos ou animais selvagens (Kelling, 1996 citado por Larson, 2005).

Os rebanhos devem ser permanentemente monitorizados para determinar a presença de animais PI. Se a presença de animais PI é confirmada ou fortemente suspeita, deverá ser despistada a presença do vírus persistente em todo o rebanho, através de IHC de amostras de pele ou por PCR, de modo a identificar e remover indivíduos PI. Um segundo despiste no ano seguinte é aconselhável em explorações onde o risco de exposição a outros animais PI é maior (Larson, 2005).

A biossegurança é importante para prevenir a exposição do rebanho a animais PI ou com infecção aguda, especialmente após a remoção dos animais PI, pois com a remoção destes irá haver um decréscimo do número de animais seropositivos por exposição natural (Kelling, 1996 citado por Larson, 2005). Todas as substituições de novilhas e de touros na exploração, tanto criados como comprados, devem ser testados antes da sua reprodução de modo a confirmar que não são animais PI. Se é comprada uma fêmea gestante, esta deve ser separada das restantes reprodutoras até estar confirmado que tanto a mãe como o vitelo não são PI. O contacto com o gado de explorações vizinhas deve ser gerido de maneira a que os restantes animais não estejam adjacentes ao grupo das fêmeas reprodutoras, principalmente durante o início da gestação, bem

como rebanhos vizinhos devem ter medidas de biossegurança e de vacinação em curso (Larson, 2005).

A biossegurança também envolve a aplicação de um programa vacinal para reduzir o risco de infecção fetal quando houver exposição a animais virémicos (Larson, 2005). As vacinas vivas modificadas conferem uma protecção mais completa contra a infecção transplacentária (Kelling, 1996 citado por Larson, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). Por esta razão, é recomendado vacinar novilhas saudáveis e separadas das fêmeas gestantes com este tipo de vacinas, devendo usá-las com precaução em animais altamente stressados (Kelling, 2004; Larson, 2005; Kahn *et al.*, 2007). A administração das vacinas deve ser programada para que a resposta imune protectora coincida com os primeiros 4 meses de gestação, maximizando o potencial da imunidade adequada para a protecção contra infecções fetais, falhas reprodutivas e o nascimento de animais PI (Kelling, 2004; Larson, 2005). Assim, aumenta-se a imunidade das reprodutoras, principalmente pelo aumento dos títulos de anticorpos seroneutralizantes, contra a infecção aguda, bem como a transmissão do BVDV para o feto antes dos 120-150 dias de gestação (Thurmond, 2005). Se as novilhas não estiverem previamente vacinadas, a primovacinação deve ser efectuada duas vezes: a primeira dose deve ser administrada aos 6 meses de idade e a segunda dose deve ser administrada dois meses (3 ciclos éstricos) antes de serem beneficiadas (Andrews *et al.*, 2004; Kelling, 2004; Larson, 2005).

Em algumas explorações, os vitelos são vacinados ainda muito novos, quando os títulos de anticorpos maternos estão elevados, restringindo a replicação da vacina. Nestes casos, os vitelos devem ser revacinados alguns meses mais tarde, quando os níveis de anticorpos maternos já tenham diminuído (Kelling, 2004).

Os bovinos de carne devem ser revacinados anualmente antes da sua reprodução (Kelling, 1996 citado por Larson, 2005; Flores, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Gondim, 2006).

9.2.3. Bovinos em sistema *feedlot*

Como a gestação não é comum nem desejável neste tipo de rebanhos, a transmissão vertical e as perdas reprodutivas devido ao BVDV não é preocupante (Larson, 2005). Contudo, a mistura de diferentes grupos de vitelos no mesmo rebanho é um factor de risco associado à doença respiratória bovina, tendo sido associados casos de virémia ou seroconversão do BVDV em surtos de doença respiratória. As infecções agudas causadas pelo BVDV poderão causar a doença respiratória em animais stressados (Brock, 2003; Larson, 2005; Grooms *et al.*, 2006b). Assim, neste sistema de produção o BVDV assume o papel de agente imunossupressor e de

potenciador de outras doenças, como é o caso da doença respiratória bovina (Campbell, 2004). A vacinação contra o BVDV antes da ocorrência da doença respiratória pode minimizar as consequências que se seguem à infecção, reduzindo a gravidade da infecção por outros agentes patogénicos envolvidos no complexo da doença respiratória (Grooms *et al.*, 2006b).

Os animais PI são a fonte primária de transmissão do BVDV através do contacto com animais susceptíveis durante exposições, transporte ou mesmo em pastagens e manjedouras (Smith e Grotelueschen, 2004; Larson, 2005). A vacinação à chegada à exploração é normalmente considerada com intervenção primária de controlo do BVDV em bovinos de recria e engorda (Campbell, 2004; Larson, 2005). Procedimentos de acompanhamento e examinação dos animais para verificar a presença de indivíduos PI na compra ou na chegada à exploração não têm sido adequadamente avaliados para um retorno económico viável. O retorno económico dependerá da prevalência de animais PI, da sensibilidade e especificidade do teste usado, bem como do valor económico da doença nos rebanhos (Larson, 2005).

Contudo, programas voluntários de erradicação do BVDV, bem como programas de certificação da exploração, podem proporcionar aos produtores a aquisição de animais com menores riscos de infecção persistente. Em conjunto com programas de vacinação, este tipo de esforços fornece uma oportunidade para diminuir os efeitos do BVDV nas doenças infecciosas dos vitelos de recria e engorda (Campbell, 2004).

II. Estudo da seroprevalência de BVDV em explorações de bovinos de carne no Alentejo

1. Introdução

A Diarreia Viral Bovina é mundialmente reconhecida como uma doença infecciosa que causa perdas, por vezes elevadas. Portugal não foge à regra. Em Portugal existem alguns estudos efectuados em vacas leiteiras (Ribeiro e Pereira, 2004) ou em algumas vacadas de aptidão cárnica (Stilwell *et al.*, 2007). No entanto, estes estudos estão reportados às regiões Norte e Centro do País, não se conhecendo, mesmo assim, o real impacto a nível produtivo e reprodutivo e, consequentemente, económico nas explorações portuguesas.

No Sul do País, não são por nós conhecidos resultados de estudos sobre esta afecção. Contudo, foi recentemente reportada a situação da região adjacente da Andaluzia (Espanha), onde a BVD assume expressão significativa (Gómez-Pacheco *et al.*, 2009). Por exemplo, nesta região espanhola, a seroprevalência de animais vacinados é de 61,2%, enquanto dos não vacinados corresponde a 42,3%, indicando que os animais vacinados têm mais de o dobro de probabilidade de serem seropositivos (Gómez-Pacheco *et al.*, 2009). Em muitas explorações do Alentejo não é efectuada uma gestão do manejo reprodutivo de forma a obter-se, de forma directa, dados reprodutivos concretos como é o caso da fertilidade de um animal, levando ao desconhecimento do real impacto reprodutivo da doença em bovinos de carne em extensivo.

Este trabalho tem como principal objectivo a determinação da seroprevalência da Diarreia Viral Bovina, através da pesquisa de anticorpos anti-BVDV, em explorações de bovinos de carne distribuídas pela região do Alentejo, pois a situação é praticamente desconhecida nesta região do país. Devido à situação geográfica da região do Alto e Baixo Alentejo, situado entre o Ribatejo e a região espanhola de Andaluzia, nas quais existem pelo menos um estudo de seroprevalência em bovinos de carne, outro objectivo deste trabalho será a comparação da seroprevalência entre os estudos efectuados nestas regiões.

Esta tese foi efectuada no âmbito de um estágio de trabalho clínico de campo e laboratório. Consequentemente, representa a tentativa, julgamos alcançada, de adquirir e aplicar conhecimentos e competências no âmbito estrito do estudo de sobrevivência desta doença. No entanto, não foi descurada a componente prática de buiatria globalizante, sem a qual não é possível levar a bom porto os pressupostos do processo de Bolonha.

2. Material e métodos

2.1. Animais, natureza das explorações e amostras

O estudo decorreu entre Janeiro e Março de 2009 e incidiu sobre 20 (**Figura 3**) das 43 explorações de bovinos de aptidão de carne dispersas na região do Alentejo em que um dos nossos orientadores é o veterinário clínico e responsável sanitário. A escolha destas explorações esteve dependente do plano sanitário oficial anual (de acordo com o Artigo 14º, Anexo I do Decreto-Lei n.º 157/98 de 9 de Junho; Decreto-Lei n.º 179/98 de 3 de Julho; Portaria n.º 430/98 de 25 de Julho; Decreto-Lei n.º 114/99 de 14 de Abril; Decreto-Lei n.º 244/2000 de 27 de Setembro; e Decreto-Lei n.º 272/2000 de 8 de Novembro), não constituindo por estes motivos amostra válida para o estudo epidemiológico completo da região.

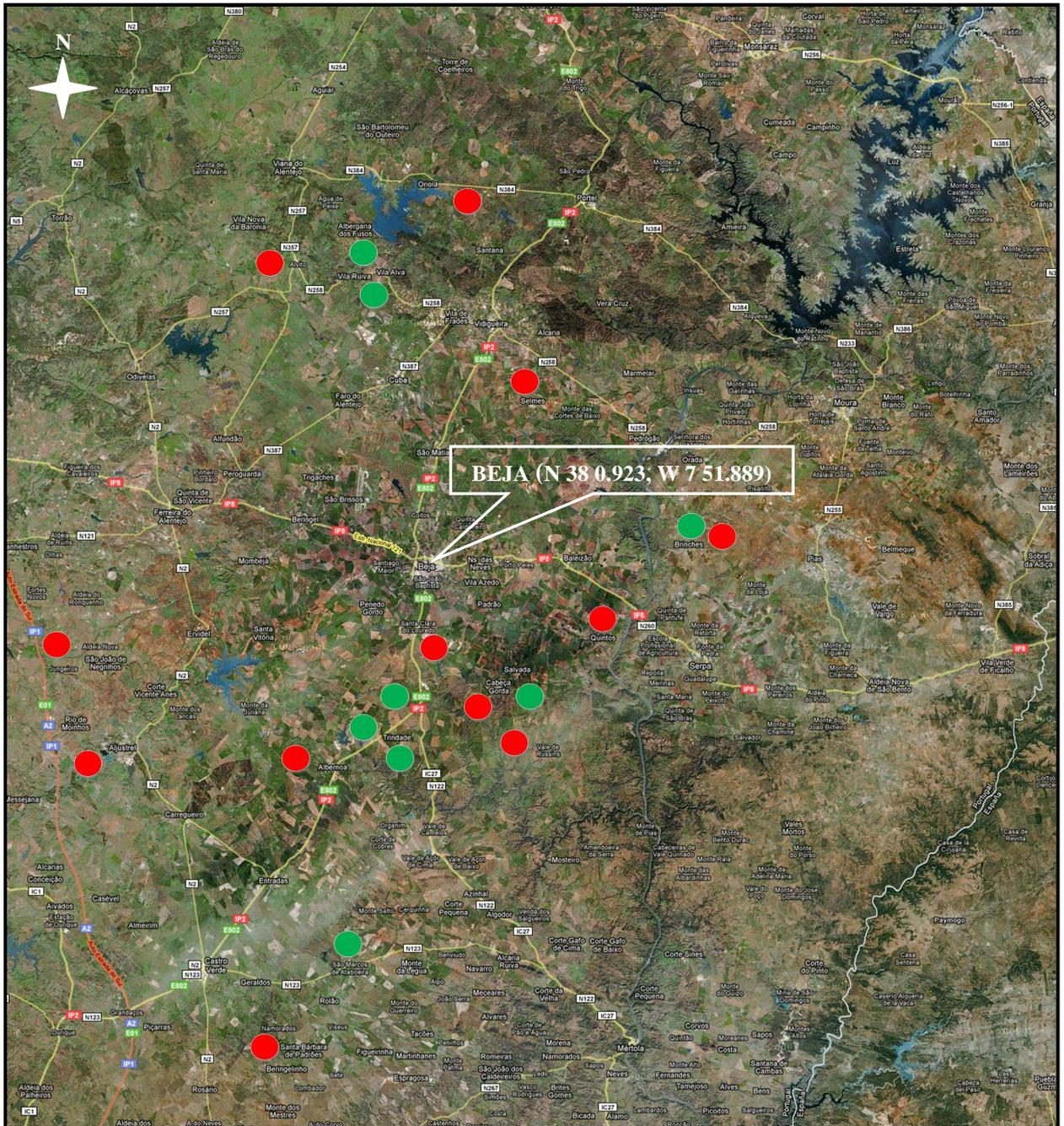
As explorações estudadas, numeradas de 1 a 20 de forma a manter o anonimato, constituíam populações abertas em regime extensivo. Do efectivo global, 86,9% (3165/3642) eram fêmeas e 13,1% (477/3642) machos ($p < 0,001$). Relativamente às raças encontradas, observou-se uma predominância ($p < 0,001$) de cruzamentos entre raças (82,3%; 2998/3642) comparativamente a raças puras (17,7%; 644/3642). Assim, no início do estudo, 9,4% dos bovinos estavam classificados na raça pura Mertolenga, 7,3% da raça Alentejana, 0,9% da raça Limousine e 0,1% da raça Charolesa. Relativamente aos restantes animais de carne, 29,4% dos animais eram cruzados de Limousine, 1,7% cruzados de Charolês, 0,9% de cruzados de Limousine, 0,1% cruzados de Alentejana e a grande maioria (51,1%) sem origem de cruzamento suficientemente definido.

Todos os animais destas explorações não se encontravam vacinados contra o BVDV. No entanto, como as populações são abertas, com entrada e saída de animais, é desconhecido o estatuto vacinal das explorações de origem aquando da compra de animais com excepção das explorações nº 3, 4, 6, 7, 12, 14, 17 e 18, as quais adquiriram os novilhos destinados para reprodução numa única exploração (A) não vacinada, bem como das explorações nº 8, 10, 15, 16, 19 e 20, cuja aquisição dos novilhos foi efectuada a partir de outra exploração (B) não vacinada. Nas explorações nº 5, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 19 e 20 a origem das fêmeas adquiridas é diversa. Em nenhum dos casos os animais introduzidos na exploração são colocados em quarentena efectiva.

A dimensão da amostragem para cada exploração-alvo, foi calculada através da fórmula (Toma *et al.*, 2004):

$$n = [1 - (\alpha)^{1/D}] \times \left[N - \frac{D}{2} \right] + 1$$

em que: n = dimensão da amostra; α = probabilidade de não ter nenhum doente entre os n animais tirados à sorte de uma população N ; N = dimensão da população; D = número de unidades doentes na população.



- Explorações visitadas cujos animais analisados não possuem anticorpos contra o BVDV (8);
- Explorações visitadas onde existe pelo menos um animal analisado que possui anticorpos contra o BVDV (12).

Figura 3 - Localização das explorações analisadas (Fonte: fotografia aérea adaptada de www.maps.google.pt).

Desta forma, foi apurada uma amostragem total de 111 animais, considerando uma prevalência esperada em cada exploração de 50%, para um intervalo de confiança de 95%.

No momento da colheita, teve-se em consideração a população total da exploração, machos e fêmeas, com idades superiores ou iguais a 1 ano. Nenhum dos animais tinha qualquer registo de doença clínica. As amostras foram colhidas aleatoriamente dentro do rebanho, no momento em que os animais eram introduzidos na manga de contenção para a realização de intervenções sanitárias de rotina.

O sangue foi colhido a partir da veia coccígea para tubos de vácuo de uso único e sem nenhum aditivo para permitir a coagulação do sangue e a separação do soro, utilizando agulhas descartáveis 1,2 x 40 mm (Nipro[®], Nipro Europa, Bélgica) e imediatamente refrigerados e transportados em sacos térmicos, embora sem controlo de temperatura. As amostras de sangue colhidas ficavam armazenadas até 72 horas no frigorífico a uma temperatura entre 2 a 4°C (tempo de espera para a leitura da tuberculinização), seguindo posteriormente para o Laboratório Veterinário de Beja, propriedade da Associação de Criadores de Ovinos do Sul.

Procedeu-se, no laboratório, à imediata decantação dos soros para tubos identificados com o número de requisição e número da identificação auricular do animal e ao congelamento dos soros a uma temperatura de, aproximadamente, -24°C. No dia anterior à determinação sorológica, procedeu-se ao descongelamento das amostras totais a temperatura ambiente, sendo seguidamente transferidas para tubos tipo Micronic[®] (Micronic, Holanda).

2.2. Ensaio das análises

A análise das amostras foi efectuada imunoensaio de competição para pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD no soro sanguíneo, através da utilização do *kit* comercial INGEZIM BVD Compac[®], com a referência 12.BVD.K3, do fabricante INGENASA (Imunologia e Genética Aplicada, S.A., Madrid, Espanha). Segundo o fabricante, trata-se de um ensaio imunoenzimático de competição para a detecção de anticorpos específicos contra o antígeno NS3 (p80) do BVDV em amostras de soro. As vantagens da detecção da proteína NS3 (p80) por este método encontram-se descritas por Gómez-Pacheco *et al.* (2009).

Antes do início do ensaio, o soro foi previamente diluído numa proporção 1:10 e todos os componentes do *kit*, com excepção do conjugado, foram mantidos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram colocados 100 µl dos soros controlo e das amostras em cada pocinho da placa, a qual foi fechada para incubação, durante 1 hora, a 37°C. Foram utilizadas 2 placas no total, em que numa os 96 pocinhos foram ocupados na totalidade, enquanto na outra foram

utilizados apenas 23 pocinhos, incluindo em ambas as placas 2 pocinhos para o soro controlo positivo e 2 pocinhos para o soro controlo negativo. Sem retirar os soros, adicionou-se 50 µl de conjugado a cada pocinho e agitou-se a placa suavemente para que se misturem os reactivos, tendo cuidado para que não ocorram intercâmbios de fluidos entre os pocinhos. Manteve-se 1 hora a temperatura ambiente (25°C). Seguidamente, lavaram-se as placas 5 vezes através do lavador automático Anthos fluido[®] (Anthos, Áustria). Depois, adicionou-se 100 µl de substrato por pocinho e manteve-se a reacção durante 15 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Passado este tempo, voltou-se a adicionar 100 µl de solução STOP (ácido sulfúrico) com o objectivo de parar a reacção. Esta solução provoca a alteração da cor da amostra, de azul para amarelo, sendo que as amostras positivas apresentarão uma coloração amarela clara e as amostras negativas apresentarão coloração amarela intensa, visíveis a olho nu. Efectuou-se a leitura dos pocinhos a 450 nm, através do leitor de microplacas Anthos 2010[®] versão 1.7. (Anthos, Áustria).

Na interpretação dos resultados, o teste apenas se considera válido se a absorvância do soro controlo positivo é menor que 0,4 e a absorvância do soro controlo negativo é maior que 0,8. As amostras consideram-se positivas quando o seu valor de absorvância seja inferior ao *cut off* positivo (calculado pela multiplicação da absorvância média do controlo negativo por 0,5), e negativas quando for superior ao *cut off* negativo (calculado pela multiplicação da absorvância média do controlo negativo por 0,55). Os soros cuja absorvância permaneça entre os dois *cut off* são considerados duvidosos.

2.3. Análise estatística

Para determinação da seroprevalência de anticorpos contra BVDV foi usado o teste do qui-quadrado, assim como o cálculo do coeficiente de contingência e o teste V de Cramer para o estudo de independência das variáveis Exploração x Seroprevalência. Os cálculos foram efectuados com recurso ao programa SPSS 17.0[®] (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

3. Resultados

Foi observado, tendencialmente, a presença de seropositivos e/ou duvidosos em 65% (13/20) das explorações em estudo, enquanto que 35% (7/20; $p=0,06$) não apresentaram titulações indicativas do contacto com o BVDV (**Gráfico 1**).

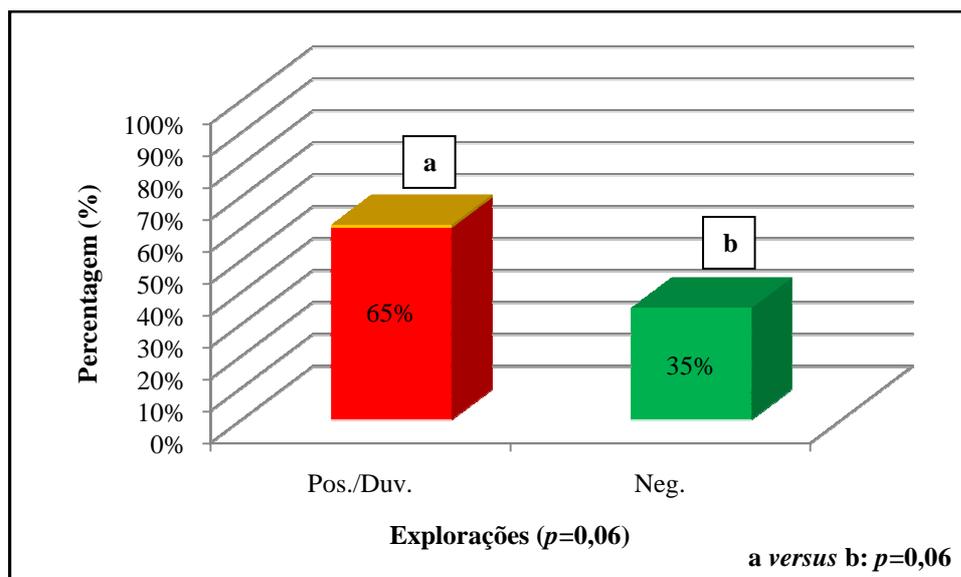


Gráfico 1 - Frequência de anticorpos contra o BVDV na totalidade das explorações estudadas.

Independentemente das explorações, observaram-se que a maioria ($p=0,001$) das amostras foram negativas (63,1%; 70/111) quando comparadas com as amostras positivas e duvidosas como o indicado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Seroprevalência de anticorpos contra o BVDV em todas as explorações testadas.

N.º de explorações avaliadas	Amostras						Seroprevalência (%)
	Positivas		Negativas		Duvidosas		
	n	%	n	%	n	%	
20	39	35,1	70	63,1	2	1,8	35,1

Foi observado, no entanto, que a seroprevalência está relacionada com a origem da exploração. De facto, a associação dos factores Exploração x Prevalência é extremamente significativa ($p<0,001$) para os valores do qui-quadrado de Pearson ($\chi^2=72,18$; Graus de liberdade=19), e para o coeficiente de contingência de 0,631 e o valor do teste V de Cramer de 0,813. As diferentes prevalências por exploração podem ser observadas no **Gráfico 2**.

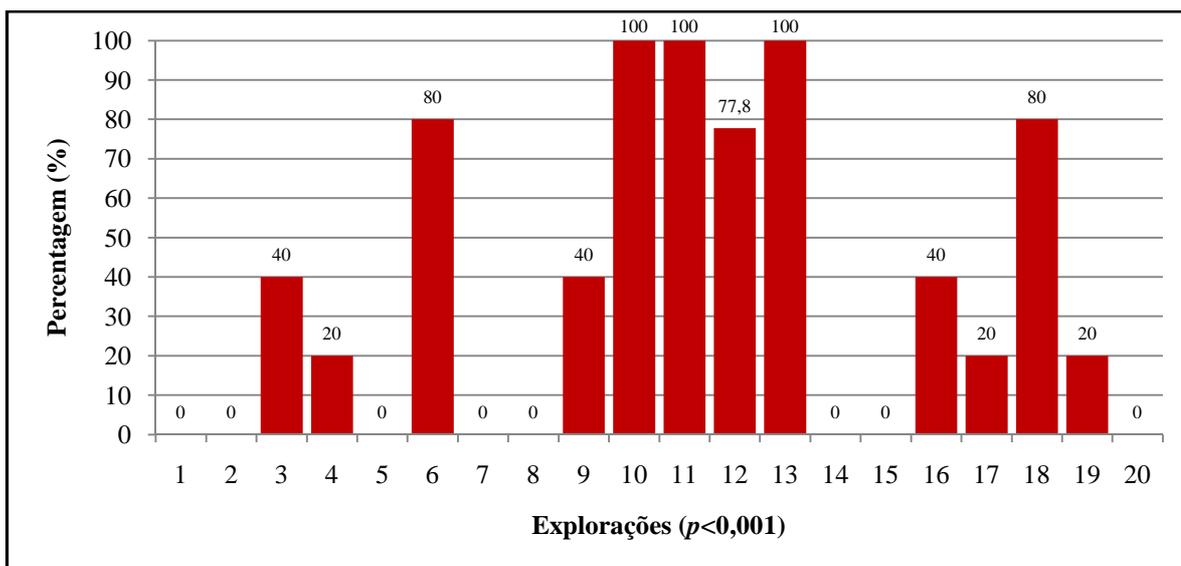


Gráfico 2 - Frequência de anticorpos contra o BVDV (amostras positivas) observada em cada exploração.

Na **Tabela 3**, encontram-se descritores de forma completa a origem, grandeza e resultados das amostras. É de notar que nas explorações onde foram detectadas amostras positivas, a seroprevalência varia entre 20% e 100%, sendo que metade das explorações com seropositividade (6/12) apresentam uma frequência de anticorpos anti-BVDV maior que 75%. No percentil 25, encontram-se 25% (3/12) das explorações.

Entre as explorações com seropositividade estavam presentes 2165 bovinos, sendo o efectivo médio de 180 animais por exploração, com um mínimo de 85 animais e um máximo de 356 animais.

De acordo com a origem da compra de animais, conforme foi descrito anteriormente, observa-se que das 8 explorações que possuem novilhos provenientes da exploração (A) apenas em 2 (25%) não houve a confirmação de amostras positivas, contra as 6 afectadas (75%; $p=0,05$). Por sua vez, verifica-se que em metade das explorações (3/6) que adquirem os novilhos na exploração (B) possuem amostras consideradas positivas. Em relação às fêmeas de diferentes origens, 7 em 9 explorações têm amostras positivas ($p=0,02$).

Tabela 3 - Seroprevalência de anticorpos contra o BVDV em cada exploração avaliada.

<i>Identificação das explorações</i>	<i>Efectivo total</i>		<i>Efectivo com idade ≥ 1 ano</i>		<i>N.º de amostras para o estudo</i>	<i>Positivos</i>		<i>Negativos</i>		<i>Duvidosos</i>		<i>Seroprevalência (%)</i>
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>		<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	
1	357	9,8	318	89,1	5	0	0	5	100	0	0	0
2	200	5,5	148	74	8	0	0	8	100	0	0	0
3	232	6,4	158	68,1	5	2	40	3	60	0	0	40
4	168	4,6	130	77,4	5	1	20	4	80	0	0	20
5	184	5,1	130	70,1	5	0	0	5	100	0	0	0
6	160	4,4	142	88,8	5	4	80	1	20	0	0	80
7	127	3,5	114	89,8	5	0	0	4	80	1	20	0
8	120	3,3	109	90,8	5	0	0	5	100	0	0	0
9	125	3,4	91	72,8	5	2	40	3	60	0	0	40
10	274	7,5	171	62,4	5	5	100	0	0	0	0	100
11	85	2,3	60	70,6	5	5	100	0	0	0	0	100
12	356	9,8	201	56,5	9	7	77,8	1	11,1	1	11,1	77,8
13	205	5,6	178	86,8	5	5	100	0	0	0	0	100
14	250	6,9	212	84,8	9	0	0	9	100	0	0	0
15	177	4,8	138	78	5	0	0	5	100	0	0	0
16	116	3,2	86	74,1	5	2	40	3	60	0	0	40
17	156	4,3	105	67,3	5	1	20	4	80	0	0	20
18	141	3,9	103	73,1	5	4	80	1	20	0	0	80
19	147	4,0	93	63,3	5	1	20	4	80	0	0	20
20	62	1,7	53	85,5	5	0	0	5	100	0	0	0
Total	3642	100	2740	75,2	111	39	35,1	70	63,1	2	1,8	35,1

4. Discussão

No nosso estudo, observámos que existiu uma tendência para uma maior percentagem de explorações (65%) que apresentaram titulações positivas e/ou duvidosas ao BVDV. No entanto, observaram-se níveis de seroprevalência inferiores a 25% no percentil 25 das explorações afectadas, o que associado a uma exploração onde foi observado um único caso duvidoso entre as restantes amostras negativas, sugere um grau de magnitude similar entre explorações afectadas e não afectadas. De facto, se as amostras duvidosas fossem consideradas negativas (Ribeiro e Pereira, 2004) para efeito de cálculo da prevalência de explorações positivas esta similaridade estaria mais evidenciada.

A frequência de anticorpos contra o BVDV presentes nas 111 amostras de soro bovino colhidas em 20 explorações das regiões do Alto e Baixo Alentejo, obtida através de um teste ELISA de competição foi de 35,1% ($p < 0,001$), sendo que 65% das explorações possuíam amostras positivas. Estes resultados são próximos daqueles obtidos por Gómez-Pacheco *et al.* (2009), em que obteve uma seroprevalência de 42,3% para animais não vacinados e 61,2% para animais vacinados em explorações bovícolas na região de Andaluzia (Espanha), das quais 70,9% explorações não vacinadas e 100% das explorações vacinadas apresentavam animais positivos. Da mesma forma, os resultados do presente estudo também estão próximos dos obtidos por Bhatia *et al.* (2008) que observou uma seroprevalência na ordem dos 37,6% em bovinos da Índia; Luzzago *et al.* (2008) obteve 31,1% de seroprevalência em 71% em vacadas de leite da região norte de Itália; e Talafha *et al.* (2008), cuja seroprevalência foi de 31,6%, em 77,4% das explorações de leite analisadas na Jordânia. O método de pesquisa de anticorpos anti-BVDV foi comum em todos os trabalhos mencionados (ELISA de competição).

Contudo, a seropositividade obtida neste estudo é inferior àquela obtida por Stilwell *et al.* (2007) em explorações de bovinos de carne do Ribatejo (Portugal), cujo valor foi 84,6%, utilizando o método ELISA de bloqueio; bem como daquela verificada por Ribeiro e Pereira (2004) em vacadas de leite e carne de 2 concelhos de Entre Douro e Minho (Portugal), correspondendo a 63,3% de amostras positivas através do método ELISA de competição. Pode-se, então, afirmar que as diferenças entre as prevalências podem estar relacionadas com a metodologia, bem como à origem, manejo, tipos de criação e de aptidão dos animais testados.

No Brasil, Quincozes *et al.* (2007) verificou que 66,32% das amostras colhidas foram positivas através da prova de seroneutralização, com detecção de bovinos serologicamente positivos em 82,35% das explorações testadas na região sul de Rio Grande do Sul. Neste estudo e de acordo com alguns dos factores avaliados, a seroprevalência distribuiu-se em: 66,18% em explorações de bovinos de carne, 53,23% em explorações de bovinos de leite, e 77,24% em explorações de aptidão mista. Por sua vez, Samara *et al.* (2004) detectou uma prevalência média de anticorpos de 57,18% em 100% das explorações de bovinos de leite analisadas nas regiões sul de estado de Minas Gerais e nordeste de estado de São Paulo (Brasil), através da técnica ELISA indirecto; já Guimarães *et al.* (2001) encontrou seroprevalências de 47,83% e 52,17%, obtidas através da técnica ELISA e seroneutralização, respectivamente, em explorações de bovinos cujo regime de criação era semi-extensivo, na região de Goiânia (Brasil). Ainda na América do Sul, Guarino *et al.* (2008) estimou que cerca de 69% dos bovinos de carne do Uruguai têm estado expostos ao BVDV, sendo que a prevalência de anticorpos para o BVDV em rebanhos vacinados

é de 77%, enquanto para os não vacinados é de 67%, através do método ELISA; a nível nacional, estima-se que a prevalência de bovinos expostos ao BVDV seja de 100%. Por sua vez, Meléndez e Donovan (2003) detectaram anticorpos em amostras de leite de mistura do tanque de refrigeração em explorações de bovinos de leite do Chile, através da técnica ELISA indirecto, sendo que a proporção de rebanhos positivos oscilavam entre 71,2% e 83% por região. Todos estes valores de prevalências são superiores aos obtidos no presente estudo, constatando que uma seroprevalência de 35,1% está abaixo da prevalência de animais seropositivos predominante em todo o mundo (entre 60% e 85%) (Houe, 1999). Algumas pesquisas em vacadas de leite obtiveram a seroprevalência em algumas regiões da União Europeia: 95% na Inglaterra e País de Gales, 46% na Áustria, 64% na Dinamarca, 46% na Suécia, 19% na Noruega e menos de 1% na Finlândia (Greiser-Wilke *et al.*, 2003).

Na maioria das vezes, a disseminação do BVDV entre explorações ocorre pela aquisição de novos bovinos PI ou que estejam prenhes de fetos PI (Houe, 1999; Thurmond, 2005), ou através da aquisição de bovinos com virémia transitória (Grooms *et al.*, 2006b). Neste estudo verificou-se que em 11 das 12 explorações com amostras seropositivas são adquiridos animais provenientes de outras explorações, podendo considerar-se a entrada de animais como um potencial factor de risco para a entrada do BVDV nas explorações em estudo.

Todavia, o BVDV também se pode distribuir numa exploração através da inseminação artificial (Fray *et al.*, 2000) ou mesmo por monta natural. Assim, pode-se afirmar que as 20 explorações testadas utilizam a cobertura natural como manejo reprodutivo, indicando, em caso de infecção, que esta não tem origem em inseminação artificial, sendo o touro PI ou com infecção transitória. Outras formas de introdução do BVDV em explorações susceptíveis, tais como o contacto com bovinos de outras explorações através da exposição em feiras e concursos, de pastagens comunitárias ou de cercas, bem como o contacto com outras espécies consideradas como prováveis fontes de infecção (ovinos, caprinos, suínos e ruminantes silvestres) e o uso de vacinas vivas contaminadas durante o processo de fabrico não foram consideradas para o presente estudo. Assim, com o défice de informação acerca das potenciais portas de entrada do vírus, não é possível determinar com toda a certeza as causas e formas de entrada do BVDV nas explorações.

Em cerca de metade das explorações seropositivas existe grande percentagem de anticorpos anti-BVDV (acima de 75%), sugerindo a presença de pelo menos um animal PI nas explorações. Estes dados vão de acordo com os descritos por Houe (1999), Wittum *et al.* (2001) e Campbell (2004), que sugerem a presença de animais PI como a fonte de manutenção do

BVDV numa exploração, conduzindo a uma alta prevalência de animais seropositivos, já que as infecções agudas são transitórias e o vírus é eliminado em pequenas quantidades, sendo menos provável a infecção de animais susceptíveis. Contudo, a prevalência de animais PI não foi avaliada, visto que os animais PI são frequentemente seronegativos quando se submetem a técnicas de detecção de anticorpos (Gómez-Pacheco *et al.*, 2009) e, assim, implicar a pesquisa de antígenos. Por outro lado, a prevalência máxima de animais PI numa exploração sem programas de controlo contra a BVD varia entre 1% e 2% (Houe, 1999), provavelmente devida à mortalidade neonatal, pois os animais morrem antes de serem testados (Wittum *et al.*, 2001). Porém, apesar da alta mortalidade entre os vitelos PI, alguns podem chegar a adultos e reproduzir-se, havendo sempre na descendência animais PI (Gómez-Pacheco *et al.*, 2009). Nestes efectivos seropositivos é recomendável instituir um programa de controlo com o objectivo de diminuir as prevalências detectadas na maior parte das explorações. Assim, antes de tomar alguma atitude, é necessário realizar um diagnóstico de situação à exploração, no qual a realização de um inquérito para obter informações sobre os potenciais factores de risco da introdução do BVDV na exploração e as técnicas laboratoriais existentes serão os pontos iniciais para obter a primeira noção do estado da exploração. A biossegurança, para a prevenir novas infecções, pode ser realizada utilizando-se uma combinação entre a remoção gradual e a eliminação dos animais PI, realização de quarentenas antes da introdução ou adição de bovinos na exploração, bem como de exames serológicos periódicos, procurando impedir a reintrodução de animais infectados no rebanho. A possibilidade de contacto directo ou indirecto com outros animais exteriores à exploração também deve ser avaliada. Para a prevenção e controlo da BVD nestas explorações, devem-se utilizar também programas vacinais como medida de controlo adicional, para reforçar a imunidade dos animais anteriormente infectados e fornecer imunidade aos susceptíveis – animais imunocompetentes e, sobretudo, fêmeas gestantes. Brock (2004) afirma que apesar de não ser 100% efectiva, a vacinação fornece às fêmeas reprodutoras alguns níveis de anticorpos anti-BVDV e a protecção fetal parece aumentar. Por sua vez, o uso contínuo de programas de vacinação irá reduzir as perdas potenciais devidas à introdução do BVDV e, especialmente, em situações onde ocorrem a mistura de animais provenientes de diferentes grupos populacionais (Brock, 2004). É de salientar que efectuar apenas a vacinação, sem a remoção dos animais PI, pouco ou nenhum efeito tem para diminuir a prevalência do vírus na exploração (Moennig e Brownlie, 2006).

No presente estudo verificou-se a existência de 35% de explorações, nas quais não se observaram amostras positivas para o BVDV. Isto deveu-se à possibilidade das explorações

possuírem algumas características (como o tipo de manejo e a presença de raças puras) que impedem a entrada do BVDV ou, talvez, porque os criadores aplicam algumas regras de biossegurança junto do seu efectivo. Nestes casos, o controlo do BVDV nas explorações podem-se restringir apenas à biossegurança, com eliminação de animais PI e uma vigilância permanente, sendo a vacinação desnecessária nestes casos por motivos económicos pois um programa vacinal num esquema sistemático é mais caro em relação aos benefícios obtidos (Lindberg *et al.*, 2006), tanto em termos de custos de produção das vacinas, como a vacina marcada é muito mais cara que as vacinas convencionais (Moennig e Brownlie, 2006) e, ainda, porque está por provar qual é o real impacto destas vacinas na reprodução e mortalidade nos efectivos positivos.

Contudo, em regiões onde não se efectuam programas de controlo, não existem certezas se os rebanhos permanecem seronegativos para o BVDV se as explorações vizinhas não adoptam acções preventivas. Assim, se a biossegurança não é completamente assegurada, as restantes opções são ou não fazer nada, ou então aumentar a imunidade dos rebanhos através da vacinação ou da retenção dos animais PI (Wittum *et al.*, 2001). Por outro lado, os poucos conhecimentos que muitos profissionais têm sobre a importância da doença, associado à alta prevalência de animais seropositivos, podem aumentar a probabilidade de disseminação da infecção entre os rebanhos (Samara *et al.*, 2004). Assim, o requisito essencial é preservar a motivação dos criadores para continuar a testar os animais e seguir as regras de biossegurança para manter a exploração livre de BVDV depois do primeiro sucesso (Greiser-Wilke *et al.*, 2003). Deste modo, aumentando os esforços na educação e informação de criadores e médicos veterinários, tanto nos dados epidemiológicos e consequências da infecção do BVDV nos rebanhos, como no conhecimento do rácio custo-benefício, interpretação de análises laboratoriais e actividades planeadas no programa de controlo, deverão ajudar a motivar os criadores a participar e permanecer nestes programas (Greiser-Wilke *et al.*, 2003; Sandvik, 2004).

5. Considerações finais

Para finalizar este estudo e através da análise dos resultados obtidos concluímos que:

1. A seroprevalência de anticorpos contra o BVDV obtida nas 20 explorações (35,1%) é similar à obtida na região da Andaluzia (Espanha) em efectivos não vacinados.
2. Foi observada uma tendência para a existência de uma maior percentagem de explorações com titulações positivas e/ou duvidosas (65%) relativamente às explorações negativas, indicando a necessidade de alterações de índole zootécnica e veterinária.
3. Em metade das explorações seropositivas a frequência de animais positivos é maior que 75%, indicando que a infecção se encontra activa com a presença de pelo menos um animal PI nas explorações.
4. Os anticorpos encontrados são maioritariamente devido à exposição natural, pois estas explorações não adoptam programas de vacinação para prevenir e controlar a doença.
5. O valor da seroprevalência obtida não permite caracterizar epidemiologicamente a região do Alentejo, uma vez que na metodologia só foram contempladas explorações de acordo com o plano sanitário da responsabilidade do nosso orientador.
6. Baseando-se nos dados de prevalência e na presença de animais PI nas explorações, recomenda-se que sejam tomadas medidas de prevenção e controlo contra as infecções pelo BVDV, nessas explorações.
7. Este trabalho é um estudo preliminar sem a preocupação de conhecer a seroprevalência da infecção provocada pelo BVDV na totalidade da região do Alentejo. Contudo, pelo grau de seroprevalência verificado, dever-se-á estudar o impacto provocado pela infecção por BVDV na reprodução, de forma a decidir sobre as medidas a aplicar.

III. Referências bibliográficas

- Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle. 2ª ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2004:853-857.
- APIFARMA, CESA. Simposium Veterinário Apifarma 2007-2008. Lisboa, Portugal, 2007:124-136.
- Barros SC, Ramos F, Paupério S, Thompson G, Fevereiro M. Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Research*. 2006;118:192-195.
- Bhatia S, Sood R, Mishra N, Pattnaik B, Pradhan HK. Development and evaluation of a MAb based competitive-ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis of bovine viral diarrhoea in cattle and buffaloes. *Res Vet Sci*. 2008;85:39-45.
- Brock KV. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin Food Anim*. 2004;20:171-180.
- Brock KV. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*. 2003;31:133-135.
- Brock KV, Grooms DL, Givens MD. Reproductive Disease and Persistent Infections. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:145-156.
- Brock KV, McCarty K, Chase CCL, Harland R. Protection against Fetal Infection with Either Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 1 or Type 2 Using a Noncytopathic Type 1 Modified-Live Virus Vaccine. *Vet Therapeutics*. 2006;7(1):27-34.
- BVDV: Control & Prevention. Acesso em: www.stopbvd.com (18/02/09), 2005.
- Campbell JR. Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot. *Vet Clin Food Anim*. 2004;20:39-50.
- Castrucci G, Frigeri F, Osburn BI, Ferrari M, Sawyer MM, Aldrovandi V. A study of some pathogenic aspects of bovine viral diarrhoea virus infection. In: Liess B, Moennig V, Pohlenz J, Trautwein G, eds. *Ruminant Pestivirus Infections: Virology, Pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis*. Archives of Virology – Supplementum 3. Wien, Austria and New York, USA: Springer-Verlag, 1991:101-108.
- Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med*. 2002;55:137-153.
- Deregt D, Loewen KG. Bovine viral diarrhoea virus: Biotypes and disease. *Can Vet J*. 1995;36:371-378.

- Deregt D. Introduction and History. In: Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:3-33.
- Edwards S, Wood L, Brockman S, Iyata G. Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently-infected seropositive survivors. In: Liess B, Moennig V, Pohlenz J, Trautwein G, eds. Ruminant Pestivirus Infections: Virology, Pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis. Archives of Virology – Supplementum 3. Wien, Austria and New York, USA: Springer-Verlag, 1991:125-132.
- Evermann JF, Barrington G. Clinical Features. In: Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:105-119.
- Falcone E, Cordioli P, Tarantino M, Muscillo M, Sala G, Rosa GL, Archetti IL, Marianelli C, Lombardi G, Tollis M. Experimental Infection of Calves with Bovine Viral Diarrhoea Virus Type-2 (BVDV-2) Isolated from a Contaminated Vaccine. Vet Res Communications. 2003;27:577-589.
- Flores EF. Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). *Biológico*, São Paulo. 2003;65(1-2): 3-9.
- Flores EF, Weiblen R, Vogel FSF, Roehle PM, Alfieri AA, Pituco EM. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq Vet Bras*. 2005;25(3):125-134.
- Fourichon C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med*. 2005;72:177-181.
- Fray MD, Paton DJ, Alenius S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci*. 2000;60-61:615-627.
- Fulton RW. Vaccines. In: Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:209-222.
- Gómez-Pacheco JM, Tarradas-Iglesias C, Luque-Moreno I, Arenas-Casas AJ, Maldonado-Borrego JL, González MA, Perea-Remujo JA. Seroprevalencia de las infecciones por el virus Diarrea Vírica Bovina en ganado bovino en Andalucía. *Rev Electron Vet*. 2009;10(2):1-11.
- Gondim ACLO. Diarréia Viral Bovina. Curso de Pós-Graduação “Latu Sensu” em Produção e Reprodução de Bovinos, Universidade Castelo Branco. Brasília, Brasil, 2006.
- Goyal SM. Diagnosis. In: Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:197-208.

- Greiser-Wilke I, Grummer B, Moennig V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*. 2003;31:113-118.
- Grooms DL. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriog*. 2006a;66:624-628.
- Grooms D, Baker JC, Ames TR. Doenças causadas pelo vírus da diarréia viral bovina. In: Smith BP. *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3ª ed. São Paulo, Brasil: Manole, 2006b:707-714.
- Guarino H, Núñez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med*. 2008;85:34-40.
- Guimarães PLSN, Chaves NST, Silva LAF, Acypreste CS. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina em bovinos, em regime de criação semi-extensivo. *Ciência Animal Brasileira*. 2001;2(1):35-40.
- Gunn GJ, Stott AW, Humphry RW. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. *The Vet J*. 2004;167:143-149.
- Gunn GJ, Saatkamp HW, Humphry RW, Stott AW. Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med*. 2005;72:149-162.
- Heuer C, Healy A, Zerbini C. Economic Effects of Exposure to Bovine Viral Diarrhoea Virus on Dairy Herds in New Zealand. *J Dairy Sci*. 2007;90:5428-5438.
- Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea (BVDV) infections. *Vet Microbiol*. 1999;64:89-107.
- Houe H. Economic impact of BVD infection in dairies. *Biologicals*. 2003;31:137-143.
- Kahn CM. *Manual Merck de Veterinaria*. Vol. 1. 6ª ed. Barcelona, Espanha: Editorial Océano, 2007:215-218,1172.
- Kapil S, Walz P, Wilkerson M, Minocha H. Immunity and Immunosuppression. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:157-170.
- Kelling CL. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Clin Food Anim*. 2004;20:115-129.
- Larson RL. Management Systems and Control Programs. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:223-238.

- Larsson B, Jacobsson S-O, Mengtsson B, Alenius S. Congenital curly haircoat as a symptom of persistent infection with bovine virus diarrhoea virus in calves. In: Liess B, Moennig V, Pohlenz J, Trautwein G, eds. Ruminant Pestivirus Infections: Virology, Pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis. Archives of Virology – Supplementum 3. Wien, Austria and New York, USA: Springer-Verlag, 1991:143-148.
- Laureyns J, Ribbens S, 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. 2009; doi:10.1016/j.tvjl.2008.11.04 (In Press).
- Liebler-Tenorio EM. Pathogenesis. In: Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:121-143.
- Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, Houe H, Moennig V, Saatkamp HW, Sandvik T, Valle PS. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. Rev sci tech Off int Epiz. 2006;25(3):961-979.
- Luzzago C, Frigerio M, Piccinini R, Daprà V, Zecconi A. A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy. The Vet J. 2008;177:236-241.
- Meléndez P, Donovan A. Herd-level ELISA seroprevalence of bovine viral diarrhoea antibodies in bulk-tank milk in Chilean dairy herds. Prev Vet Med. 2003;60:237-241.
- Moennig V, Brownlie J. Vaccines and vaccination strategies. EU Thematic network on BVDV control position paper. 2006:73-98.
- OIE – World Organization for Animal Health. Chapter 2.4.8. – Bovine Viral Diarrhoea. In: Terrestrial Animal Health Code. OIE Terrestrial Manual. 2008:698-711.
- Olafson P, MacCallum AD, Fox FH. An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell Vet. 1946;36:205-213.
- Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, Givens MD, Maxwell HS, Brock KV. Experimental persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in white-tailed deer. Vet Microbiol. 2007;122:350-356.
- Quincozes CG, Fischer G, Hübner SO, Vargas GDA, Vidor T, Brod CS. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. Semina Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. 2007;28(2):269-276.

- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 9^a ed. London, UK: W. B. Saunders, 2000:1085-1105.
- Ribeiro JN, Pereira A. Aspectos da epidemiologia da infecção e persistência do vírus da diarreia viral bovina em explorações de bovinos leiteiros. *Rev Port Cienc Vet*. 2004;99:41-51.
- Ridpath JF. Classification and Molecular Biology. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:65-80.
- Samara SI, Dias FC, Moreira SPG. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. *Brazilian J Vet Res and Anim Sci*. 2004;41:396-403.
- Smith DR, Grotelueschen DM. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin Food Anim*. 2004;20:131-149.
- Smith RL, Sanderson MW, Renter DG, Larson RL, White BJ. A stochastic model to assess the risk of introduction of bovine viral diarrhoea virus to beef cow-calf herds. *Prev Vet Med*. 2009;88:101-108.
- Stilwell G, Matos M, Carolino N. A seroprevalência de anticorpos contra quatro vírus respiratórios em vacadas de carne do Ribatejo. *Rev Port Cienc Vet*. 2007;102:97-105.
- Sandvik T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet Clin Food Anim*. 2004;20:151-169.
- Talafha AQ, Hirche SM, Ababneh MM, Al-Majali AM, Ababneh MM. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. *Trop Anim Health Prod*. 2008; DOI 10.1007/s11250-008-9214-6 (In Press).
- Toma B, Dufour B, Sanaa M, Benet J-J, Shaw A, Moutou F, Louzã A. *Epidemiologia aplicada: à luta colectiva contra as principais doenças animais transmissíveis*. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004:579-580.
- Thurmond MC. Virus Transmission. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:91-104.
- Valle PS, Skjerve E, Martin SW, Larssen RB, Østerås O, Nyberg O. Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev Vet Med*. 2005;72:189-207.
- Vilček Š, Nettleton PF. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol*. 2006;116:1-12.

Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock KV, Kvasnicka WG, Floyd JG, Kelling CL, Odde KG.
Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in US Beef Herds. *Prev Vet Med.*
2001;49:83-9