



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

ALINE DO SOCORRO LIMA KZAM

**UTILIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS
DA DIARREIA BOVINA E DA *Brucella abortus* EM VACAS DE CORTE DA RAÇA
NELORE**

**BELÉM-PA
2013**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ALINE DO SOCORRO LIMA KZAM

UTILIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA BOVINA E DA *Brucella abortus* EM VACAS DE CORTE DA RAÇA NELORE

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: **Saúde e Meio Ambiente**

Orientador: **Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana**

Co-Orientador: **Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb**

BELÉM-PA
2013

Kzam, Aline do Socorro Lima Kzam

Utilização de ensaio imunoenzimático para detecção do vírus da diarreia bovina e da *Brucella abortus* em vacas de corte da raça nelore. / Aline do Socorro Lima Kzam. - Belém, 2013.

86 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, 2013.

1. Bovinos 2. Brucelose 3. ELISA 4. BVD

CDD - 636.2089



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ALINE DO SOCORRO LIMA KZAM

**UTILIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS
DA DIARREIA BOVINA E DA *Brucella abortus* EM VACAS DE CORTE DA RAÇA
NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em agosto 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana – Orientador

Universidade Federal Rural da Amazônia

Profa. Dra. Carla Cristina Guimarães de Moraes 1ª Examinadora

Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Washington Luiz de Assunção Pereira – 2º Examinador

Universidade Federal Rural da Amazônia

Profa. Dra. Andréa Maria Góes Negrão – 3ª Examinadora

Universidade Federal Rural da Amazônia

*“Você não pode ensinar nada a um homem;
você pode apenas ajudá-lo a encontrar a resposta dentro dele mesmo”*
Galileo Galilei

*“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto,
não é um feito, mas um hábito”.*
Aristóteles

À Deus

*Meu refúgio e fortaleza, iluminador dos meus passos e
acalentador de minha alma*

*À Aref Kalilo Lima Kzam e Áthila Lima Kzam,
pelo amor incondicional, pelo carinho e amizade
e por toda compreensão*

*À Neuza Maria Lima e Maria José Lima (Bia)
pela inesgotável fonte de amor e pelo apoio
nas horas certas e incertas*

*À Christinaldo Argemiro de Souza Kzam
por ser o mais verdadeiro exemplo de caráter
honestidade e bondade no coração*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana**, pela sua orientação, ensinamentos e indispensável ajuda e energia para a condução, execução e revisão deste trabalho.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb**, pela grande colaboração e orientação na execução dos testes.

À **GMinssen Assessoria Rural**, pela viabilização das fazendas e apoio logístico.

Ao Médico Veterinário **Ricardo Paz**, pela confiança e viabilização das propriedades.

Ao Instituto Biológico de São Paulo - Laboratório de Vírus de Bovídeos, em especial a **Dra. Liria Okuda**, **Dra. Cláudia Pestana** e **Alisete Assumpção**, pela presteza em nos ajudar na execução do estudo.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus Jaboticabal, em especial à Médica Veterinária **Msc. Glaucenyra Cecília Pinheiro da Silva**, pela inestimável e incansável ajuda, bem como por todo o carinho com que nos auxiliou durante a fase experimental deste trabalho.

Ao Médico Veterinário **Msc. Sandro Patroca**, pela disponibilidade, paciência e auxílio durante o processamento das amostras.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello**, solicitude e importante contribuição.

Ao Médico Veterinário **Msc. Bruno Moura Monteiro**, pela obsequiosidade.

Ao Grupo de Pesquisa em Andrologia, Inseminação Artificial, Sanidade e Melhoramento Genético de Bovinos e Bubalinos (GAIA), ao **PETVet** e aos **Jovens Talentos**, pela dedicação e apoio durante todas as fases de realização da pesquisa, em especial aos alunos **André Mendonça**, **Damázio Campos**, **Gabriel Furtado** e **Maria Beatriz Freitas**, pela companhia durante as viagens e processamento das amostras, e por tornarem as noites em claro mais agradáveis de serem enfrentadas.

Aos amigos de pós-graduação **Eliomar Sousa**, **Antônio Soares** e **Pedro Ermita** pelo carinho e companheirismo durante nossa trajetória.

À **CAPES/CNPq** pelo fomento concedido para realização do experimento por meio do **CT - AÇÃO TRANSVERSAL / Chamada Pública MCT/CNPq/MEC/CAPES - Ação Transversal nº 06/2011 - Casadinho/Procad Processo nº 552215/2011-2**.

À **Dra. Sílvia Zimmerman**, **Dra. Andréa Carneiro** e à **Dra. Karen Vigorito da IDEXX/MADASA**, pela colaboração na obtenção dos kits.

À **Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará - ADEPARÁ**, pela generosidade em disponibilizar dados para o enriquecimento da pesquisa e por todo o apoio logístico e operacional.

Aos proprietários das fazendas, os quais nos cederam prontamente suas propriedades para que pudéssemos realizar parte do estudo, bem como a todos os funcionários, que nos receberam cordialmente e se dispuseram a nos ajudar de maneira incansável durante a colheita do material.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, pela fonte de conhecimento e salutar convívio.

À todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, em especial ao Sr. Reinaldo Carvalho, pela competência, agilidade e toda solicitude dispensada.

À todos os funcionários do Instituto de Saúde e Produção Animal, por prontidão e atenção em nos ajudar.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana

Ao Mestre, pela generosidade, confiança e valorosos ensinamentos. A ele, minha profunda gratidão, respeito e admiração pela destreza com que exerce a Medicina Veterinária.

Ao amigo, pela paciência, compreensão, companheirismo e apoio incondicional durante mais esta etapa de minha trajetória acadêmica.

O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.

*Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente
a águas tranquilas.*

*Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da
justiça, por amor do seu nome.*

*Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte,
não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua
vara e o teu cajado me consolam.*

*Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus
inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice
transborda.*

*Certamente que a bondade e a misericórdia me
seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na
casa do Senhor por longos dias.”.*

(Salmos 23:1-6)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** A. Localização das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense; B. Municípios: Castanhal (alfinete azul), São Francisco do Pará (alfinete verde), Garrafão do Norte (alfinete azul claro), Santa Izabel do Pará (alfinete amarelo) e Capitão Poço (alfinete rosa). **43**
- Figura 2** A. Momento da colheita sanguínea; B. Amostras após centrifugação. **44**
- Figura 3** A e B. Distribuição dos controles e amostras na placa. Tiras D12 e E12: controles positivos (vermelho); F12 e G12: controles negativos (azul); H12: controle padrão (branco). **46**
- Figura 4** A. Momento da leitura do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT); B. Amostra com formação de grumos, evidenciando resultado positivo. **49**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Resistência de <i>Brucella</i> sp. em algumas condições ambientais.	33
Quadro 2	Caracterização dos locais do experimento e da amostragem em cada rebanho estudado, de acordo com a fazenda e o município.	44
Quadro 3	Fórmulas utilizadas para calcular a validação do teste de diagnóstico do vírus da diarreia viral bovina e o resultado para interpretação das amostras.	47
Quadro 4	Fórmulas utilizadas para calcular a validação do teste de diagnóstico da brucelose bovina e o resultado para interpretação das amostras.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudo retrospectivo da prevalência de animais soropositivos à brucelose bovina em diferentes municípios do estado do Pará.	37
Tabela 2	Resultados dos testes de vírusneutralização e ELISA BVDV Total Ab Test para a detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em amostras de soro sanguíneo.	53
Tabela 3	Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina nas diferentes propriedades estudadas, de acordo com o teste utilizado.	56
Tabela 4	Resultado do BVDV Total Ab Test frente à vírusneutralização em bovinos de corte da raça nelore, criados no estado do Pará.	57
Tabela 5	Sensibilidade (%), especificidade (%), valor preditivo positivo (%) e valor preditivo negativo (%) do ELISA BVDV Total Ab Test.	58
Tabela 6	Distribuição dos títulos de anticorpos no teste de vírusneutralização e a respectiva densidade óptica (DO) das amostras de soro pelo ELISA BVDV Total Ab Test.	60
Tabela 7	Resultados dos testes de fixação do complemento, ELISA Chekit Brucellose Serum e antígeno acidificado tamponado para a detecção de anticorpos contra a Brucella abortus em amostras de soro bovino.	61
Tabela 8	Resultado do ELISA Chekit Brucellose Serum frente à fixação do complemento em bovinos de corte da raça nelore, criados no estado do Pará.	63
Tabela 9	Resultado do antígeno acidificado tamponado frente à fixação do complemento em bovinos de corte da raça nelore, criados no estado do Pará.	63
Tabela 10	Sensibilidade (%), especificidade (%), valor preditivo positivo (%) e valor preditivo negativo (%), do ELISA Chekit Brucellose Serum e antígeno acidificado tamponado, associados ao resultado da fixação do complemento.	63
Tabela 11	Prevalência da infecção pela Brucella abortus nas diferentes propriedades estudadas, de acordo com o teste utilizado.	67

SUMÁRIO

	RESUMO	17
	ABSTRACT	18
1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OBJETIVOS	23
1.1.1	Geral	23
1.1.2	Específicos	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD)	25
2.2	BRUCELOSE BOVINA	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	43
3.2	DESENHO EXPERIMENTAL	43
3.3	COLHEITA DE SANGUE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	44
3.4	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADAS	45
3.4.1	Diarreia Viral Bovina	45
3.4.1.1	Vírusneutralização (VN)	45
3.4.1.2	ELISA indireto	46
3.4.2	Brucelose Bovina	48
3.4.2.1	Teste de Fixação do Complemento (FC)	48
3.4.2.2	Antígeno Acidificado Tamponado	49
3.4.2.3	ELISA indireto	49
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	DIARREIA VIRAL BOVINA	53

4.2	BRUCELOSE BOVINA	61
5	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	72

RESUMO

KZAM, A.S.L. **Utilização de ensaio imunoenzimático para detecção do vírus da diarreia bovina e da *Brucella abortus* em vacas de corte da raça Nelore.** 86.f. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia. Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, 2013.

O diagnóstico de enfermidades infectocontagiosas representa um valioso mecanismo que vem se tornando cada vez mais utilizado com a finalidade da descoberta, confirmação e levantamento das enfermidades nos rebanhos. Assim, objetivou-se com esse estudo, avaliar o desempenho de kits comerciais de ELISA indireto (ELISA-I) na detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e contra a *Brucella abortus*, frente ao teste de virusneutralização (VN) para a diarreia viral bovina (BVD) e teste de fixação do complemento (FC) e antígeno acidificado tamponado (AAT) para a brucelose bovina, além de determinar a prevalência de animais soropositivos para os respectivos agentes etiológicos nos rebanhos estudados nos municípios das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense, e avaliar a eficácia dos métodos, mediante comparação entre os resultados obtidos. Para tanto, foram processadas 400 amostras de soro de fêmeas bovinas da raça Nelore com idade ≥ 24 meses, não vacinadas contra BVD e vacinadas contra a brucelose, provenientes de cinco propriedades, sendo duas da Mesorregião Metropolitana de Belém e três da Mesorregião do Nordeste Paraense. Os testes de ELISA-I e AAT foram realizados na Universidade Federal Rural da Amazônia de acordo com o preconizado pelo fabricante; a VN no Instituto Biológico de São Paulo e a FC na Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”- Campus Jaboticabal. Os resultados verificados foram classificados como diagnóstico positivo correto (a), diagnóstico positivo incorreto (b), diagnóstico negativo correto (c), diagnóstico negativo incorreto (d). A partir desses valores foram calculados, de cada método, a sensibilidade e especificidade. Para a BVD, as amostras que se apresentaram suspeitas frente ao ELISA-I não foram contabilizadas nos cálculos supramencionados. O teste Qui quadrado foi utilizado para comparar as sensibilidades e especificidades do ELISA-I e do AAT para a brucelose. Os resultados de prevalência para a BVD obtidos pela VN e ELISA-I foram iguais a 39,25% e 54,50%, respectivamente, e o ELISA-I apresentou 98,72% de sensibilidade e 74,07% de especificidade. Para a brucelose bovina, a prevalência obtida pelas técnicas de FC, AAT e ELISA-I foram iguais, respectivamente, a 5,0%, 4,5% e 23,75% ($p < 0,0001$). Os valores de sensibilidade encontrados para o AAT e ELISA-I corresponderam a 45% e 75% e a especificidade 97,63% e 78,95%, respectivamente. Houve diferenças significativas entre a especificidade do AAT e ELISA-I ($p < 0,0001$). Baseado nos resultados, concluiu-se que tanto a BVD quanto a brucelose bovina encontram-se presentes em animais criados nas Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense. Ainda, o ELISA-I constitui-se uma alternativa a ser usada em testes de triagem para a detecção de anticorpos anti-BVDV e anti-*B. abortus* (nesta última, associada com outras provas sorológicas, como o AAT).

Palavras-chave: bovinos, BVD, brucelose, ELISA, diagnóstico.

ABSTRACT

KZAM, A.S.L. Using immunoenzymatic assay for the detection of bovine virus diarrhoea and Brucella abortus in Nelore beef Cows. 86.f. Dissertation - Postgraduate Program in Animal Health and Production in the Amazon. Federal Rural University of Amazonia, Pará, 2013.

Diagnosis of infectious diseases is a valuable mechanism that is becoming increasingly used for the purpose of discovery, confirmation and lifting of the disease in herds. Thus, the aim of this study was to evaluate the performance of commercial indirect ELISA kits (ELISA-I) for the detection of antibodies against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and against *Brucella abortus*, opposite the virus neutralization test (VN) for bovine viral diarrhoea (BVD) and complement fixation (FC) and buffered acidified antigen (AAT) for bovine brucellosis, and to determine the prevalence of seropositive animals to their etiological agents in herds in the cities of Mesoregions Metropolitan of Belém and Northeast of Pará, and evaluate the effectiveness of the methods by comparing the results obtained. For this, we processed 400 serum samples from Nelore cows aged ≥ 24 months not vaccinated against BVD and vaccinated against brucellosis, from five properties, two of them from Mesoregion Metropolitan of Belém and three from Mesoregion Northeast of Pará. The ELISA-I and AAT tests were performed at Federal Rural University of Amazonia in accordance with the recommendations by the manufacturer; the VN in the Biological Institute of São Paulo and the FC at State University "Júlio de Mesquita Filho" - Campus Jaboticabal. The outcomes were classified as correct positive diagnosis (a), incorrect positive diagnosis (b), correct negative diagnosis (c), incorrect negative diagnosis (d). From these values were calculated for each method, the sensitivity and specificity. The Chi square test was used to compare the sensitivities and specificities of ELISA-I and AAT for brucellosis. The results for the prevalence of BVD obtained by VN and ELISA-I were equal to 39.25% and 54.50%, respectively and ELISA-I showed 98.72% sensitivity and 74.07% specificity. For bovine brucellosis, the prevalence obtained by FC, AAT and ELISA-I were respectively 5.00%, 4.50% and 23.75% ($p < 0.0001$). The sensitivity found for the AAT and ELISA-I were 45,00% and 75,00% and specificity of 97.63% and 78.95%, respectively. There were significant differences between the specificity of AAT and ELISA-I ($p < 0.0001$). Based on the results, it was concluded that both BVD as bovine brucellosis are present in animals raised in the Metropolitan Mesoregions Metropolitan of Belém and Northeast of Pará. Further, the ELISA-I constitutes a surrogate to be used in screening tests for the detection of anti-BVBD and anti-*B. abortus* antibodies (the latter one associated with other serological tests, such as the AAT).

Keywords: beef cattle, BVD, brucellosis, ELISA, diagnosis.

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é um dos setores que mais têm contribuído para o crescimento econômico do Brasil nos últimos anos. A pecuária bovina, em particular, tem tido um papel de destaque frente à esse crescimento, uma vez que no ano de 2011 participou com 6,12% no produto interno bruto (PIB) do país movimentando, aproximadamente, R\$ 250,920 bilhões. Esse desenvolvimento é reflexo do aumento do contingente populacional de bovinos que atingiu 212,8 milhões de cabeças no ano de 2011, evidenciando um aumento de 1,6% em comparação ao ano anterior (IBGE, 2012) e da exportação de carne bovina, em torno de 1,5 milhões de toneladas (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA, 2012).

Nesse cenário promissor da pecuária de corte nacional, o estado do Pará vem apresentando crescente destaque, tanto por possuir um rebanho bovino expressivo, da ordem de 19.043.522 cabeças, como por participar de maneira significativa das receitas da pecuária nacional com a exportação de 404.853 animais vivos (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA, 2012). Além disso, o estado apresenta características naturais de interesse econômico relevante, como extensas áreas produtivas, características climáticas favoráveis e logística para escoamento da produção (FUNDEPEC, 2011).

Embora o Brasil se destaque no contexto pecuário mundial, problemas relacionados ao manejo sanitário ainda são muito frequentes. De acordo com Viana e Zanini (2009), a sanidade assume um papel de fundamental importância em qualquer que seja o sistema de exploração, e ações como controle das enfermidades, prevenção contra novas doenças e aumento da resistência imunológica dos animais, contribuem para um excelente status sanitário do rebanho.

Na bovinocultura de corte, o conhecimento das doenças infectocontagiosas constitui-se um ponto fundamental para que as medidas de prevenção, controle e erradicação sejam bem estabelecidas, uma vez que muitas doenças acarretam perdas econômicas substanciais, destacando-se entre elas a diarreia viral bovina e a brucelose bovina.

A diarreia viral bovina (BVD) é causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), um vírus RNA de fita simples e envelopado pertencente ao gênero Pestivirus da família Flaviviridae (GOYAL; RIDPATH, 2008), e é classificado em dois tipos, BVDV-1 e BVDV-2, e em duas cepas diferentes, a citopatogênica (CP) e a não citopatogênica (NCP) (RIDPATH, 2010).

É uma doença com distribuição mundial, que acarreta perdas substanciais, tanto para a bovinocultura de corte quanto para de leite (BRÜLISAUER et al., 2010). De acordo com Lindberg et al. (2006), a prevalência mundial de anticorpos anti-BVDV varia de 40 a 90% nos animais e a prevalência de rebanhos com infecção ativa ou recentemente infectados varia de 47 a 100% (SARRAZIN et al., 2013). Em todo o Brasil, estudos revelam que o agente está amplamente disseminado nos rebanhos e nas propriedades (FLORES et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2006; BRITO et al., 2010; CHAVES et al., 2010; STURZA, 2011; OLIVEIRA et al., 2012; FINO et al., 2013; SOUSA et al., 2013).

A infecção pelo BVDV acarreta grandes perdas econômicas (SARRAZIN et al., 2013), uma vez que é capaz de produzir um amplo espectro de manifestações nos sistemas respiratório, gastroentérico, linfático, reprodutivo e no feto, este último culminando em animais persistentemente infectados (FULTON, 2013).

Historicamente, o isolamento do vírus em culturas de células de bovinos constitui-se como o método “gold standard” para o diagnóstico definitivo de BVD, pois possibilita o diagnóstico do agente etiológico (TAKIUCHI et al., 2001; DUBOVI, 2013). Normalmente, este teste é seguido pela detecção de antígenos virais, como a imunofluorescência, imunoperoxidase ou ELISA direto; ou detecção do genoma viral, por técnicas moleculares como a hibridação e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (GOYAL, 2005). Entretanto, o isolamento viral é uma técnica laboriosa, de custo elevado e dispendiosa em relação ao tempo dedicado para a sua elaboração (TAKIUCHI et al., 2001).

Levando-se em consideração o diagnóstico sorológico dessas enfermidades, a vírusneutralização (VN) é considerada a técnica “gold standard” para a detecção de anticorpos específicos (GOYAL, 2005). Atualmente, tem-se utilizado um grande número de kits comerciais de ELISA indiretos (ELISA-I) para o diagnóstico da BVD (MACHADO, 2013), uma vez que este apresenta baixo custo se comparado com os outros testes disponíveis, é de fácil execução e possibilita a utilização de amostras de soro sanguíneo e de leite (NISKANEN et al., 2010).

A Brucelose Bovina é uma antroponose, de evolução crônica, que tem como agente etiológico a *Brucella abortus*, um bacilo gram-negativo, aeróbio, imóvel, não capsulado, de multiplicação lenta e que não formam esporos (MATHIAS; RIET-CORREA, 2007). É uma doença infectocontagiosa e pode ser transmitida pelo contato direto ou indireto com os animais infectados e seus produtos (BRASIL, 2006).

É uma doença de ampla distribuição mundial, estando presente em mais de 128 países, tendo sido erradicada em alguns, principalmente na Europa, porém ainda bastante disseminada na África, Ásia, América do Sul e países do Mediterrâneo (OIE, 2009). No Brasil é considerada uma doença endêmica, sendo diagnosticada em todos os estados da Federação (DIAS, 2004; SIKUSAWA, 2004; NEGREIROS, 2008; FREITAS et al., 2008; SILVA, 2008; VILLAR, 2008; MARVULO, 2009; OGATA, 2009; MINERVINO et al., 2011).

Em bovinos, a brucelose provoca perdas diretas em decorrência de abortamentos, diminuição dos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, queda na produção de leite e carne, morte de bezerros, além da interrupção de linhagens genéticas e perda de prestígio para as propriedades acometidas pela doença (OLINTO et al., 2012).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) preconiza a utilização de testes em série para o diagnóstico indireto da brucelose, estando reconhecidos como oficiais o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), sendo os resultados positivos confirmados pela combinação do teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) associado ao teste de soroglutinação lenta em tubos (SAL) ou teste de fixação de complemento (FC), este último como teste conclusivo (BRASIL, 2006).

O teste AAT apresenta a vantagem de ser rápido e de baixo custo, enquanto que na combinação dos testes do 2-ME e o SAL, o tempo para a obtenção dos resultados torna-se longo (48 horas), há o uso de grande quantidade de reagentes e substâncias tóxicas e nocivas, além da possibilidade de ocorrência do efeito prozona, levando à resultados falso-negativos (MATHIAS et al., 2010).

A FC constitui-se como uma técnica bastante laboriosa, que exige equipes bem treinadas para a obtenção de um resultado confiável; utilização de reagentes lábeis que precisam ser constantemente preparados e titulados; ocorrência de atividade anticomplementar, principalmente em amostras mal- conservadas; e ocorrência de efeito prozona, (MATHIAS et al., 2010).

Nesse contexto, os testes comerciais de ELISA-I favorecem o reconhecimento dos anticorpos reacionais ao agente etiológico, quando bem padronizadas (MOLNÁR et al., 2002), além de apresentar custo e sensibilidade que favorecem sua aplicação.

No Brasil, mais especificamente no estado do Pará, poucos têm sido os estudos relacionados ao diagnóstico e prevalência dessas enfermidades nos rebanhos sendo, portanto, de extrema necessidade a utilização de um diagnóstico rápido e eficiente bem como a elucidação da presença desses agentes na população bovina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar o desempenho de kits comerciais de ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-BVDV e anti-Brucella abortus, frente aos testes de virusneutralização e de fixação do complemento em vacas de corte zebuínas da raça Nelore, das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense.

1.1.2 Específicos

- Determinar a prevalência de anticorpos anti-BVDV e anti-Brucella abortus em vacas de corte zebuínas da raça Nelore, criadas em fazendas localizadas nas Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense;
- Verificar a viabilidade de kits comerciais de ELISA indireto para o diagnóstico da BVD e brucelose em vacas de corte zebuínas da raça Nelore;
- Determinar a especificidade e a sensibilidade de kits comerciais de ELISA indireto para a detecção de anticorpos contra o BVDV e Brucella abortus;
- Comparar a eficácia do kit comercial de ELISA indireto para o diagnóstico da BVD frente à utilização da virusneutralização para detecção de anticorpos anti-BVDV;
- Comparar a eficácia do kit comercial de ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose frente à utilização da fixação do complemento e do AAT para detecção de anticorpos anti-Brucella abortus.

REVISÃO DA LITERATURA



2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIARREIA VIRAL BOVINA (BDV)

A BVD é considerada uma das mais importantes doenças que acarretam prejuízos econômicos nos rebanhos de corte e de leite em todo o mundo (ALTAMIRANDA et al., 2012). É causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV - “Bovine Viral Diarrhoea Virus”), um Pestivirus da família Flaviviridae capaz de infectar uma grande variedade de espécies de ruminantes (BACHOFEN et al., 2010; RIDPATH, 2010). Os Pestivirus são considerados os mais bem sucedidos agentes virais presentes na natureza, uma vez que possuem capacidade de se disseminar e persistir no rebanho sem serem detectados (ALTAMIRANDA et al., 2012).

De acordo com Ribeiro (2009), o primeiro relato de BVD em bovinos foi realizado por Childs no ano de 1946 nos EUA, sendo o vírus descrito pela primeira vez por Baker et al. (1954). Cerca de onze anos após a descrição do vírus, ocorreu o primeiro relato de doença gastroentérica e, por este motivo, a enfermidade foi denominada de BVD. Vidor (1974) fez o primeiro isolamento do BVDV no Brasil a partir do sangue de feto aparentemente sadio, coletado em matadouro no Rio Grande do Sul.

No estado do Pará, Kzam et al. (2007) isolaram o BVDV, por meio da transcriptase reversa reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), de um bezerro Nelore proveniente de uma propriedade localizada na Mesorregião do Sudeste Paraense com sinais clínicos sugestivos de BVD.

O BVDV pode ser classificado em dois genótipos geneticamente diferentes: BVDV-1 e BVDV-2, com base na análise comparativa das sequências de nucleotídeos da região 5'UTR (untranslated region) do genoma (RIDPATH, 2010). Os isolados de BVDV-1 são mais frequentes e comumente utilizados na produção da vacina, testes e pesquisas diagnósticas (FLORES et al., 2005), enquanto que os isolados de BVDV-2 são, predominantemente, provenientes do soro fetal bovino, de animais permanentemente infectados (PI) nascidos de mães vacinadas contra o BVDV e de bovinos que morreram da forma aguda severa da doença (RADOSTITS et al., 2007).

Em relação à capacidade de produzir efeito citopático em células de cultivo, as amostras de BVDV podem ser classificadas em dois biótipos: não citopatogênicos (NCP) ou

citopatogênicos (CP) (RIDPATH, 2010). As amostras NCP predominam entre os isolados de campo, se constituindo em mais de 90% do total de isolados de bovinos (KALAYCIOGLU, 2007), enquanto que as amostras CP geralmente são encontradas em associação com a forma fatal da infecção denominada doenças das mucosas (DM) (RIDPATH, 2010).

O BVDV é caracterizado por sua diversidade e capacidade de estabelecer três tipos principais de infecção: infecção persistente, considerada a principal fonte de infecção; animais com infecção transitória, que são considerados uma fonte de infecção menos importante (PETERHANS et al., 2010) e infecção severa (RIDPATH; FLORES, 2007).

A infecção persistente ocorre quando fêmeas prenhes susceptíveis entram em contato com o biótipo NCP do vírus, por volta de 40 a 120 dias de gestação, promovendo a exposição do feto à este agente infectante, podendo resultar em um bezerro PI, caracterizado por imunotolerância específica para a estirpe infectante do BVDV. Esses animais constituem-se como a principal fonte de manutenção e transmissão da infecção no rebanho, pois eliminam constantemente o vírus em altos títulos nas secreções e excreções (FULTON et al., 2009; RIDPATH, 2010).

De acordo com Fulton et al. (2009), os animais PI, ao se infectarem com amostras CP do vírus, invariavelmente desenvolverão a DM. Esses animais, devido falhas no sistema imune, tornam-se susceptíveis a outras infecções, ocasionando alta mortalidade quando jovens, se comparados aos animais sadios (HOUE, 1999).

A infecção transitória ocorre quando animais imunocompetentes entram em contato com o BVDV através de aerossóis, excreções, secreções, restos fetais de aborto ou secreções fetais durante o nascimento de bezerros PI, caracterizando uma forma de contágio direta. As vias consideradas indiretas são fômites, insetos hematófagos, sêmen, embriões e/ou soro fetal contaminados (WRATHALL et al., 2006; STHAL et al., 2007; GAROUSSI; MEHRZAD, 2011).

A infecção severa apresenta baixa morbidade e alta mortalidade e ocorre quando animais PI sofrem infecção por dois biótipos do BVDV. O biótipo NCP sofre mutações ou rearranjo genético originando um biótipo CP, que determinará o surgimento da DM, sendo considerada uma consequência tardia da infecção pelo BVDV em vacas prenhes que originam animais PI (RIDPATH; FLORES, 2007).

Thurmond (2005) cita quatro fatores principais capazes de influenciar na transmissão do BVDV, sendo eles: a infecciosidade da estirpe do vírus, dada a exposição e via de infecção; a quantidade de contato direto entre um animal infectado e um animal soronegativo;

a duração do período infeccioso para o hospedeiro e/ou a prevalência da infecção no rebanho e, por último, a presença de animais verdadeiramente susceptíveis, que não possuem reação cruzada ou anticorpos específicos e/ou imunidade mediada por células necessária para evitar infecção.

Os principais prejuízos causados pela presença do BVDV em um rebanho bovino incluem redução da eficiência produtiva do rebanho, como decréscimo na produção de leite e diminuição da conversão alimentar e, conseqüentemente, do ganho de peso animal (RODNING et al., 2012), bem como redução da eficiência reprodutiva com abortamentos, nascimento de bezerros natimortos, reabsorção embrionária, infertilidade temporária, anomalias congênitas, inflamação uterina e disfunção ovariana (GROOMS, 2006).

Portanto, a BVD se estabelece como a mais comum e economicamente importante infecção que acomete os rebanhos bovinos em todo o mundo (HOUE, 1999) com prevalência variando entre e dentro dos países (LINDBERG et al., 2006; RAUE et al., 2011). Nos últimos anos, a soroprevalência desta infecção em diferentes países no mundo variou de 18% a 93% (TAN et al., 2006; DUONG et al., 2008; GUARINO et al., 2008; LEE et al., 2008; TALAFHA et al., 2008; GAROUSSI et al., 2009; HANDEL et al., 2011; SAA et al., 2012; SARRAZIN et al., 2013).

No Brasil, estudos revelam que há uma ampla distribuição da infecção pelo BVDV no rebanho bovino. Flores et al. (2005) fizeram uma coletânea dos estudos sorológicos da infecção pelo BVDV no Brasil, em diversos estados, entre os anos de 1971 a 2004, no qual constataram que a prevalência dessa infecção variou de 14,64% a 84%, em diferentes faixas etárias de rebanhos bovinos.

Junqueira et al. (2006) trabalhando com um rebanho de fêmeas bovinas da raça Nelore e novilhas F1 de cruzamento de Red Angus x Nelore, todas aptas à reprodução, proveniente da região do oeste do estado de São Paulo, encontraram uma prevalência de animais soropositivos igual a 98,0%.

Em estudo realizado em 232 municípios de Goiás, com um efetivo bovino de 3.533 fêmeas bovinas com idade acima de 24 meses, distribuídos em 888 propriedades, Brito et al. (2010) encontraram uma soroprevalência de 64% para a infecção pelo BVDV nos animais e 88,3% das propriedades apresentaram animais sorologicamente positivos. Esses dados foram similares aos encontrados por Quincozes et al. (2007) após analisarem 1.734 amostras de soro sanguíneo provenientes de bovinos de corte ou leite, machos ou fêmeas, com diferentes faixas etárias, apresentando ou não sinais clínicos de infecção por BVDV, de diferentes municípios

do Rio Grande do Sul (66,3%) e por Sousa et al. (2013), que encontraram um total de 67,3% (n=156) de vacas mestiças de holandesas criadas em São Luis, Maranhão.

Também no estado do Maranhão, Chaves et al. (2010) encontraram uma prevalência de anticorpos contra o BVDV de 61,5% (n=246) em amostras de fêmeas bovinas leiteiras; Dias et al. (2010) encontraram uma prevalência de 62,8% (n=1925) de animais reagentes ao BVDV em rebanhos naturalmente infectados no estado de São Paulo. Sturza (2011) observou 62,5% (n = 656) de resultados positivos contra o BVDV em bovinos no Rio Grande do Sul, pela combinação do teste de VN com o ELISA-I.

Mineo et al. (2006) encontraram 58,43% de amostras soropositivas de um rebanho bovino de 243 fêmeas em idade reprodutiva, procedentes da região do Triângulo Mineiro, assim como os 58,25% (n=309) encontrados por Fino et al. (2013), em fêmeas da raça Crioula Langeana criadas em de Santa Catarina. Todavia, essas prevalências diferem dos 37,37% encontrado por Freitas et al. (2011), em 91 fêmeas mestiças da raça Nelore, criadas no Maranhão.

Embora a infecção pelo BVDV normalmente curse de forma assintomática, algumas manifestações clínicas como depressão, inapetência, erosões e ulcerações na mucosa oral, decréscimo na produção de leite, diarreia, aborto, morte embrionária, má formações, problemas respiratórios e disfunção no sistema imunológico (RODNING et al., 2012), uma vez que acomete os mais variados sistemas fisiológicos, como o respiratório, hemático, imunológico, neurológico e reprodutivo (GROOMS, 2006).

De acordo com Baker (1995), as características do animal que influenciam no resultado das manifestações clínicas estão relacionadas com o estado imunológico (imunidade passiva ou ativa por infecção prévia ou vacinação), estágio das vacas prenhes, idade do feto em gestação e estresse imposto pelo ambiente.

Entretanto, embora sejam evidenciados sinais clínicos compatíveis com a BVD, estes são muitas vezes variados e até mesmo subclínicos, permitindo somente um diagnóstico presuntivo da doença, quando associado com histórico clínico e, exame post-mortem. Dessa forma, a detecção precisa e definitiva do BVDV somente pode ser realizada através de diagnóstico laboratorial (GOYAL, 2005).

Atualmente, há uma série de testes disponíveis para a detecção de antígenos, anticorpos e componentes virais do BVDV. Cada método possui suas vantagens, desvantagens e aplicabilidade específicas a cada necessidade (GOYAL, 2005).

As principais técnicas empregadas para a realização do diagnóstico da BVD descritas são: isolamento viral em monocamadas de culturas celulares de bovinos (rim, pulmão ou testículos), seguida de identificação do agente por imunofluorescência ou imunoperoxidase; ELISA direto para detecção de antígenos; detecção de DNA por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR); detecção de anticorpos séricos pela técnica de virusneutralização e detecção de anticorpos séricos pelo ELISA indireto (ELISA-I) (OIE, 2008).

A detecção de anticorpos específicos para o vírus constitui-se como uma medida indireta da infecção. Entretanto, há uma dificuldade em diferenciar os anticorpos produzidos em resposta à infecção aguda, vacinação ou transferência de imunidade materna, sendo que neste último os títulos de anticorpos começam a diminuir após 3-8 meses da ingestão do colostro (GOYAL, 2005). Dessa forma, os testes sorológicos para o BVDV podem ser utilizados com a finalidade de identificar um animal previamente infectado com o vírus ou devidamente imunizado e em bezerros pode determinar se o animal foi infectado no útero ou pós-natal ou se possui anticorpos colostrais (DUBOVI, 2013).

Dentre os testes sorológicos, a virusneutralização (VN), também chamada de soroneutralização (SN), é considerada como a técnica gold standard para a detecção de anticorpos anti-BVDV, sendo usada no mundo todo (GOYAL, 2005; OIE, 2008; DUBOVI, 2013). O teste consiste em incubar o soro animal com o vírus para possibilitar o bloqueio de estruturas virais por meio de anticorpos específicos, impedindo a interação vírus-receptor celular e cujo resultado é a inibição de efeito citopático padrão (ECP). Utiliza-se a inibição da infectividade para detectar anticorpos neutralizantes anti-BVDV, haja vista que os vírus neutralizados pelos anticorpos infectarão as células, induzindo alterações morfológicas. Se o soro contiver anticorpos específicos contra o vírus utilizado, este será neutralizado e as células permanecerão intactas. Conseqüentemente, o ECP não será observado (FULTON et al., 1995).

A VN é considerada uma técnica altamente específica para cada vírus (OIE, 2008), podendo ser utilizada para identificar a presença de anticorpos neutralizantes específicos, dependendo da estirpe viral a ser utilizada, bem como para mensurá-los (DUBOVI, 2013). Entretanto, não existe estirpe viral padrão, uma vez que os isolados utilizados variam de região para região, o que ocasiona uma variação de resultados entre laboratórios (DUBOVI, 2013). Diante disso, a estirpe pode variar entre os laboratórios de diagnóstico, embora a maioria utilize o BVDV-1, estirpes NADL ou Singer (FULTON et al., 1997; OIE, 2008). O teste de VN apresenta outras limitações como tempo de execução e processamento dos dados,

cultivo celular, instalações bem equipadas, controle de contaminação e pessoal qualificado e treinado. Além disso, não faz distinção entre imunidade natural e resposta imunológica induzida pela vacina (MAHECHA et al., 2011).

Para o diagnóstico de um grande número de amostras e para quantificar a presença de anticorpos anti-BVDV, o ELISA- I é considerado mais reprodutível e mais viável economicamente do que a VN (GONDA et al., 2012; LARSKA et al., 2013). Atualmente, estão disponíveis no mercado muitos kits comerciais de ELISA-I destinados ao diagnóstico da BVD.

Na atualidade, entre os países, há uma diferenciação quanto à escolha dos testes sorológicos a serem aplicados. Nos EUA, onde a infecção e a vacinação são frequentemente encontradas nos animais, predomina-se o uso da técnica de VN, enquanto que em países da União Europeia, onde os programas de erradicação estão em andamento e a vacinação é limitada, testes comerciais de ELISA-I têm mais utilidade (DUBOVI, 2013).

Zarkov e Jarullah (2012) comparando a VN e o ELISA-I¹ em bovinos leiteiros, analisaram 74 amostras de soro sanguíneo de duas fazendas localizadas na Bulgária, com infecção natural pelo BVDV e verificaram que a sensibilidade e especificidade do ELISA-I frente à VN foi de 93,75% e 76,92%, respectivamente. De acordo com os autores, o ELISA-I apresentou resultados falso-negativos nas amostras com diluições elevadas, indicando que há uma concentração apropriada de títulos de anticorpos para que animais soropositivos sejam identificados e, por essa razão, deve-se aguardar um intervalo de três semanas entre a infecção no animal e a colheita de amostras dos animais doentes acarretando, assim, um aumento na sensibilidade do teste.

Em um experimento cujo objetivo era estimar a correlação entre um kit comercial de ELISA-I² como substituto ao teste de VN para a detecção de anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2 em bezerros vacinados intramuscular (n=96) e intranasal (n=97) contra a BVDV, Gonda et al. (2012) utilizaram amostras de plasma (momento da vacinação) e soro sanguíneo (41 dias e 72 dias pós vacinação intramuscular e 20 dias pós vacinação intranasal) de animais provenientes de dois campus experimentais nos EUA. Os autores concluíram que o ELISA-I pode ser utilizado como um substituto da VN quando da resposta vacinal, ressaltando que o teste possui alta correlação positiva quando comparado com a detecção de anticorpos anti-BVDV-1 identificados pelo VN. Afirmam, ainda, que o ELISA-I é capaz de detectar tanto

¹ Bio-X BVDV ELISA Kit. Herd Laboratories.

² BVDV Ab ELISA, version 99-44000. IDEXX Switzerland AG, Liebefeld-Bern, Switzerland.

anticorpos anti- BVDV-1 e anti-BVDV-2, embora a correlação entre a VN para identificação da resposta frente ao BVDV-2 não seja tão alta.

Estudo realizado por Larska et al. (2013) comparando o desempenho de cinco ensaios imunoenzimáticos, mostraram sensibilidades e especificidades iguais a 98,1% e 80,7%, (1-ELISA-I³ - detecção de IgG1); 90,4% e 88,6% (2-ELISA-I⁴ - detecção de anticorpos contra o BVDV-1 e BVDV-2); 90,4% e 91% (ELISA bloqueado 1⁵ - detecção de anticorpos contra o BVDV-1, BVDV-2 e pestivírus atípicos); 100% e 84,1% (ELISA bloqueado 2 - detecção de IgG capturada de suínos previamente infectados); 100% e 75% (microsfera - composto por uma proteína recombinante), a partir de amostras sanguíneas de vitelos experimentalmente infectados com o BVDV-1 e com uma cepa atípica de Pestivirus. Cabe ressaltar que nesse estudo os autores utilizaram a VN como referência.

No Brasil, Sturza (2011) analisou 701 amostras de soro bovino no estado do Rio Grande do Sul com a finalidade de verificar a ocorrência de anticorpos anti-BVDV, por meio da comparação entre as técnicas de ELISA-I⁶ e VN. Nesse estudo, os autores tomaram como teste padrão a prova de ELISA-I e observaram que a VN apresentou uma sensibilidade igual a 76,8%, especificidade 99,5%, valor preditivo positivo 97,8% e valor preditivo negativo de 93,5% frente ao ELISA-I.

Dessa forma, os testes comerciais de ELISA surgem como uma boa alternativa para o diagnóstico dessas enfermidades, uma vez que permitem uma triagem rápida e específica de um grande número de amostras, não necessitam de culturas celulares, bem como reduz a variação entre os resultados obtidos entre os laboratórios (DUBOVI, 2013; LARSKA et al., 2013).

³ Svanovir BVDV-Ab ELISA kit (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden).

⁴ HerdChek BVDV Antibody Test Kit (IDEXX, Liebefeld-Bern, Switzerland).

⁵ Svanova Biotech. Uppsala, Sweden.

⁶ HerdChek, Idexx, Maine, EUA.

2.2 BRUCELOSE BOVINA

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa antropozoonótica de ampla distribuição mundial, que tem como agente etiológico a *Brucella abortus* (SILVA; LESSA, 2007), um cocobacilo gram-negativo aeróbio, imóvel, não capsulado, de multiplicação lenta e que não formam esporos (MATHIAS; RIET-CORREA, 2007).

A *B. abortus* possui predileção pela espécie bovina, entretanto não apresentam especificidade quanto ao rebanho que infectam. Dessa forma, a *B. abortus* também pode acometer búfalos, suínos, cães e outros animais domésticos e silvestres, os quais podem se tornar fonte de infecção para os bovinos. Nesse contexto, os cães apresentam relevância na cadeia epidemiológica da brucelose bovina, uma vez que atuam como disseminadores do agente de forma mecânica, ao carregarem produtos oriundos de aborto pelas pastagens e entre as fazendas (VASCONCELLOS et al., 1987).

Os animais silvestres são considerados reservatórios naturais do agente etiológico, sendo responsáveis pela transmissão deste para os animais domésticos, assim como pela manutenção da doença no meio ambiente não modificado pelo homem (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003) ou até mesmo na reintrodução do agente em rebanhos livres, dependendo da tipologia, abundância e dinâmica da fauna silvestre da região (METCALF et al., 1994).

A fêmea bovina apresenta elevada importância quanto à disseminação do agente etiológico, pois quando prenhas estas se tornam mais susceptíveis e, conseqüentemente, atuam como fontes de infecção, permanecendo cronicamente infectadas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Dessa forma, o agente é excretado juntamente com os fetos abortados e seus envoltórios e as descargas uterinas no momento do parto ou quando em abortamentos, contaminando assim o ambiente e servindo como fonte de infecção para os demais animais através do contato direto com esses materiais pelas membranas mucosas e pele lesada (OIE, 2009).

O material fecal de bezerros que se alimentam de leite contaminado também pode contribuir para a contaminação ambiental, entretanto, essa forma de contaminação é menor, pois o trato digestório destrói parte das bactérias (MARVULO, 2009). A transmissão sexual também pode ocorrer, embora o risco não seja significativo devido ao pH ácido e microbiota normal da mucosa vaginal atuarem como uma barreira natural. Entretanto, a inseminação artificial pode transmitir o agente, uma vez que o sêmen é depositado na cérvix ou no útero,

locais de maior predileção (OIE, 2009). A transferência de embriões – realizada segundo os protocolos internacionalmente preconizados de lavagem e tratamento para a redução da transmissão de agentes infecciosos, não apresenta risco de transmissão de brucelose entre doadoras infectadas e receptoras livres da doença (BRASIL, 2006).

As bactérias, quando em condições naturais, são muito resistentes e podem permanecer viáveis no meio ambiente por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, ampliando de forma significativa a chance de o agente entrar em contato e infectar um novo indivíduo suscetível (Quadro 1). Deste modo, o pasto pode facilmente ser contaminado, tornando-se um fator de risco importante, uma vez que o animal também pode se contaminar através da ingestão e inalação do agente (OGATA, 2009).

Quadro 1 - Resistência de *Brucella* sp. em algumas condições ambientais.

CONDIÇÃO AMBIENTAL		TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA
Luz solar direta		4 - 5 horas
Solo	Seco	4 dias
	Úmido	65 dias
	Baixas temperaturas	151 - 185 dias
Fezes		120 dias
Dejetos	Esgoto	8 - 240/700 dias
	Altas temperaturas	4 horas - 2 dias
Água	Potável	5 - 114 dias
	Poluída	30 - 150 dias
Feto à sombra		180 dias
Exsudato uterino		200 dias

Fonte: Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT (BRASIL, 2006).

Os prejuízos econômicos e a importância da doença para a saúde pública constituíram-se como pontos fundamentais para a implantação de programas de controle e/ou erradicação

da doença. De acordo com Paulin e Ferreira Neto (2003), os programas de brucelose bovina são preconizados desde 1869, entretanto sua execução em grande número de países se deu a partir da década de 1930.

Em meados de 1930, a brucelose era considerada a mais significativa doença que acometia o rebanho dos Estados Unidos e, aliado a crise econômica gerada pela Grande Depressão, o país viu a oportunidade de diminuir o rebanho bovino doente, como parte de esforços estabelecidos para recuperar a economia norte-americana. A partir de então, a doença passou a ser tratada como prioridade, e as ações de despovoamento do rebanho infectado, vigilância reforçada e manejo adequados foram implementadas, de modo que, no ano de 2000, os EUA passaram a ser considerado livre da brucelose. Já o rebanho nacional canadense foi considerado livre da brucelose no ano de 1985. (LOPES et al., 2010).

Atualmente, o monitoramento de brucelose continua na forma de vigilância ativa e passiva por meio de mecanismos de notificação da doença (LOPES et al, 2010). Entretanto, muitos países ainda apresentam o agente disseminado no rebanho.

De acordo com Huguet et al. (2005), os relatórios do Programa de Controle e Erradicação de Tuberculose e Brucelose Bovina do Peru, no ano de 2000, apontaram a região que concentra a maior bacia leiteira do país com uma prevalência de 0,06% de animais sororreagentes. Esses autores, determinando a presença da brucelose na Província de Canta, em Lima, detectaram somente dois animais positivos para a brucelose por meio do AAT, tendo sido confirmado 0,21% pelo teste da FC (1/486), animal este proveniente de uma propriedade de um dos municípios estudados, mostrando que se faz necessário à implementação da etapa de erradicação da doença nesta localidade. Em estudo realizado por

Majali et al. (2009), estudando a soroprevalência da brucelose em rebanhos bovino na Jordânia, utilizando o teste do AAT e ELISA-I⁷, encontraram 10,1% (68/671) animais e 25,8% (16/62) rebanhos soropositivos. Esses valores, quando ajustados em relação à sensibilidade e especificidade dos testes, apresentou uma prevalência real de 6,5% e 23%, para os animais e o rebanho, respectivamente.

Kaoud et al. (2010), estudando animais provenientes de 26 rebanhos bovinos no Egito, identificaram, usando o AAT, uma prevalência da infecção igual a 21,6%, sendo 17,22% destes confirmados por meio de um kit comercial de ELISA-I. De acordo com os autores, os animais de cada rebanho foram selecionados aleatoriamente usando uma tabela de números

⁷ JOVAC, Jordan.

aleatórios e, dos animais selecionados, 2,16% apresentaram-se soropositivos diante do ELISA-I.

Sikder et al. (2012), ao analisarem um rebanho constituído por 500 fêmeas bovina leiteiras criadas em Bangladesh, oriundas de criações comerciais (n=250) e de subsistência (n=250), submeteram amostras de leite ao teste do anel de leite. Os animais que apresentaram resultado positivo para esta técnica foram submetidos ao AAT e ELISA-I⁸ como provas confirmatórias, tendo sido encontrado uma média de 5% de animais soropositivos (7,6% em criações comerciais e 2,4% animais de subsistência).

No Brasil, a brucelose é considerada uma doença endêmica, sendo diagnosticada em todos os estados da Federação. No ano de 1975, foi realizado um estudo nacional envolvendo 19 estados, o qual demonstrou uma prevalência de brucelose bovina em torno de 2,5% para a região nordeste; 4,0% para região sul; 4,1% para a região norte; 6,8% no centro-oeste e 7,5% no sudeste (BRASIL, 2006).

Em 2002, surgiu uma demanda por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA de um projeto de pesquisa sobre a prevalência e os fatores de risco da brucelose bovina em todo o país (POESTER et al., 2009), sendo que os trabalhos vêm sendo efetuados em colaboração com os serviços de defesa sanitária animal de cada Unidade Federativa. Nesses estados, no período de 2001 a 2004 foram realizados inquéritos soroepidemiológicos, onde se observou que o agente está disseminado por todas as áreas pesquisadas e que a situação é heterogênea entre os estados e mesmo dentro de regiões de um mesmo estado (LAGE et al., 2008).

A situação epidemiológica do estado de Santa Catarina foi estudada por Sikusawa (2004), tendo sido determinada por meio de sorodiagnóstico de 7756 fêmeas bovinas com idade ≥ 24 meses, as quais estavam divididas em cinco circuitos produtores de bovinos. Destes, 0,06% se apresentaram como reagentes. Em relação ao quantitativo de propriedades (n=1579) apenas uma apresentou resultado positivo.

Dias (2004) determinou a prevalência da brucelose bovina em São Paulo, adotando a mesma metodologia empregada por Sikusawa (2004), tendo sido o estado dividido em cinco circuitos produtivos de bovinos, onde foram encontrados 9,7% (105/1073) de prevalência de foco da doença e 3,81% (107/8761) de fêmeas soropositivas para a doença.

Na Região Norte foram realizados estudos acerca da prevalência da brucelose em Rondônia (VILLAR, 2008) e Tocantins (OGATA, 2009), ambos considerando o rebanho de

⁸ iELISA kit, version 10-2700-10, SE-751 83. M/S Svanova Biotech AB. Uppsala, Sweden.

bovinos e bubalinos. Rondônia foi dividido em três circuitos produtivos, nos quais foram encontrados valores de 35,8% (324/921) para a prevalência de propriedades com foco e 6,22% (560/9703) para a prevalência de fêmeas sororreagentes, enquanto que Tocantins foi dividido em seis circuitos produtivos, os quais apresentaram 21,22% (377/1842) de focos para a doença e 4,43% (688/20908) de animais positivos.

Em Sergipe, Silva (2008) dividiu o estado em dois circuitos produtivos de bovinos, encontrando 12,5% (70/588) de prevalência para o foco da doença e 3,36% (134/4640) de animais soropositivos e Marvulo (2009), fazendo o levantamento da situação da brucelose no Rio Grande do Sul, dividiu o estado em sete circuitos, obtendo uma prevalência de 2,06% (63/1957) de foco e 1,02% (111/16072) de animais reagentes.

Todos os estudos acima mencionados fizeram parte do projeto de pesquisa realizado pelo MAPA em parceria com a Universidade de São Paulo e o Serviço de Defesa Agropecuário de cada estado. O protocolo de teste de sorodiagnóstico foi composto por triagem com o teste AAT seguido do reteste dos animais positivos com teste do 2-ME, de acordo com as normas do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Durante o período de agosto de 2007 a agosto de 2008 na região do Potengi, Rio Grande do Norte, Freitas et al. (2008) encontraram uma prevalência de brucelose em 6,2% dos bovinos examinados (95/1531) pela técnica do AAT e, dentre os animais positivos, observaram que as fêmeas foram mais afetadas (82,2%), quando comparadas com os machos (18,5%), ressaltando a importância desses animais na disseminação da doença.

No estado do Pará, Minervino et al. (2011) realizou um levantamento da brucelose, pela técnica do AAT em diversos municípios (Tabela 1) e observaram uma prevalência média de 10,25% (792/7724) de animais positivos.

A brucelose é uma das principais enfermidades que causam prejuízos econômicos para a exploração pecuária, os quais estão relacionados aos baixos índices produtivos como diminuição da produção de leite e de carne (condenamento de carcaças) e reprodutivos, pelo aumento do número de abortos, morte de bezerras, aumento do intervalo entre partos e baixa fertilidade, tendo efeitos desastrosos para a exploração pecuária (ACHA; SZYFRES, 2001; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; MOTA, 2011). Além disso, os rebanhos infectados tornam o valor comercial de seus animais depreciado e as regiões onde ocorre a doença ficam prejudicadas frente à disputa de novos comércios (MOTA, 2011).

Tabela 1 - Estudo retrospectivo da prevalência de animais soropositivos à brucelose bovina em diferentes municípios do estado do Pará.

Municípios	Nº animais examinados	Nº animais soropositivos	Prevalência
Alenquer	32	2	6,2%
Cachoeira do Piriá	277	27	9,7%
Concórdia do Pará	2454	220	15,1%
Monte Alegre	67	4	6,0%
Novo Repartimento	1708	210	12,3%
Oriximiná	111	11	9,9%
Pacajá	40	6	15,0%
Paragominas	354	50	14,1%
São Domingos do Capim	155	56	36,1%
Tomé-Açú	3183	206	6,5%

Fonte: Adaptado de Minervino et al. (2011).

O diagnóstico da brucelose bovina pode ser realizado pela identificação do agente por métodos diretos, ou pela detecção de anticorpos contra *B. abortus* por métodos indiretos. Os métodos diretos utilizados incluem o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica e PCR (OIE, 2009).

Para animais de corte, o PNCEBT preconiza a utilização de testes em série para o diagnóstico indireto da brucelose, estando reconhecidos como oficiais o teste do AAT, que é muito sensível e de fácil execução; o teste do 2-ME associado ao SAL, como confirmatório para os animais que reagirem ao teste anterior, por ser mais específico e o teste de FC, como teste conclusivo (BRASIL, 2006), sendo este último recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal para o trânsito internacional de animais (OIE, 2009).

O AAT é considerado um teste de triagem do rebanho que consiste em um preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa Bengala. A positividade do teste é determinada pela presença de grumos mediante a mistura do soro a ser testado e do reagente. É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado (BRASIL, 2006).

O teste da FC apresenta uma variedade de formas a ser realizado, mas normalmente utiliza-se da técnica de microtitulação, com fixação a quente ou a frio (OIE, 2009). Este teste é considerado conclusivo e confirmatório, pois apresenta alta especificidade de diagnóstico minimizando a possibilidade de descartar animais incorretamente por causa de resultados falso-positivos. Entretanto essa opção também implica aumento no custo e retardo na adoção da medida sanitária, devido ao tempo de espera pelo resultado do laboratório (MEIRELLES-BARTOLI; MATHIAS, 2009).

De acordo com Jardim et al (2009), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pretende aperfeiçoar o padrão de diagnóstico à medida que novos e melhores testes forem surgindo, os quais serão integrados a gama de exames de acordo com a viabilidade técnica e custo-benefício ao produtor. Nesse contexto, o ELISA indireto favorece o reconhecimento dos anticorpos reacionais ao agente etiológico (MOLNÁR et al., 2002), tendo o custo e a sensibilidade do teste a favor de sua aplicação em rebanhos.

Emprega-se como antígeno o lipopolissacarídeo de *B. abortus* imobilizado em placas de 96 poços. Como conjugado, utiliza-se um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina conjugado com a peroxidase. Agentes quelantes são utilizados para minimizar reações não específicas (BRASIL, 2006). Entretanto, ainda há uma escassez de estudos utilizando o ELISA-I para o diagnóstico da brucelose bovina no Brasil (PAULIN et al., 2009).

Muitos estudos desenvolvidos com a finalidade de identificar a prevalência da brucelose em diferentes regiões do mundo utilizam os mais variados kits comercial de ELISA-I, uma vez que os fabricantes propõem alta sensibilidade (86% a 97,2%) e especificidade (97,8% a 98%) dos testes (MAJALI et al., 2009; TRANGADIA et al., 2012).

Ghudasara et al. (2010) com o intuito de determinar a prevalência de anticorpos anti-*B. abortus* em fêmeas bovinas (n=107) e bubalinas (n=73), com histórico de abortamento e outras desordens reprodutivas na Índia, utilizaram três provas diagnósticas diferentes, ELISA-I⁹, AAT e SAL, tendo sido a primeira considerada como método padrão, uma vez que foi capaz de detectar um maior percentual de animais soropositivos (45/180) tendo, portanto, sensibilidade e especificidade consideradas iguais a 100%. A soroprevalência para a brucelose pelos testes de AAT e ELISA-I foram 11,21% (12/107) e 24,30% (26/107) para bovinos e 9,59% (7/73) e 26,03% (19/73) para bubalinos, respectivamente, totalizando 10,55% (10/180) e 25,00% (45/180) de resultados positivos pelo teste de AAT e ELISA-I, respectivamente.

⁹ PD-ADMAS, Bangalore.

Ainda, os autores observaram sensibilidade de 42,22% para o AAT e especificidade igual a 98,52%. O ELISA-I e o AAT apresentaram resultados concordantes em 84,44% dos casos e, por consequência, consideraram o ELISA-I como a prova de triagem mais indicada.

Sanogo et al. (2013), objetivaram avaliar o desempenho do teste AAT e um ELISA-I no diagnóstico de brucelose em 995 amostras de soro coletadas de bovinos zebuínos na Costa do Marfim entre 2005 e 2009, por meio de uma abordagem Bayesiana (utilizada quando não há uma prova gold standard tomada como padrão) para estimar a sensibilidade e especificidade de cada teste. O estudo mostrou que o AAT e o ELISA-I apresentaram sensibilidade e especificidade respectivamente iguais a 54,9% e 96,1% e 97,7% e 95,0%, e uma prevalência de brucelose igual a 4,6% nessa região. Os autores observaram uma concordância de 96,6% para amostras negativas e 52,2% de concordância para as amostras positivas. Diante disso, constataram que o ELISA-I apresentou bons parâmetros de desempenho, podendo ser considerado um valioso ensaio para detecção da infecção por meio de teste sorológico. Entretanto, ressaltam a importância de uma combinação de testes sorológicos para obtenção de resultados fidedignos, quando da ausência de um teste padrão ouro.

Na Índia, Islam et al. (2013) utilizaram 178 fêmeas bubalinas com mais de um ano de idade, sem histórico vacinal, das quais 54 já haviam abortado pelo menos uma vez, para comparar os testes de ELISA-I¹⁰, AAT, microaglutinação, microaglutinação modificada e PCR para o diagnóstico sorológico da brucelose. O ELISA-I foi comparado com todos os outros testes, apresentando alta correlação positiva com todos, exceto com o PCR. Os autores relatam também que o ELISA-I apresentou mais resultados positivos do que todos os outros métodos utilizados. Dessa forma, concluíram que o ensaio imunoenzimático indireto pode ser utilizado como teste de rotina para o diagnóstico da brucelose em búfalos.

Molnár et al. (2002), em outro estudo analisaram 440 amostras de soros de fêmeas bubalinas com idade superior a 36 meses compararam a utilização de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose, tendo sido escolhido o ELISA-c1 como referência para os demais testes (duas provas de aglutinação - Soroaglutinação rápida - SAR¹¹ e AAT¹², duas de ELISA-I¹³, sendo a primeira composta por conjugado antibovino de cadeia leve e na segunda foi utilizado conjugado contra IgG total bovino; e duas de ELISA competitivo (ELISA-c),

¹⁰ BioNote, Korea. Catalogue nº EB 43-01.

¹¹ Tecpar - Instituto de Tecnologia do Paraná

¹² Tecpar - Instituto de Tecnologia do Paraná

¹³ Animal Production Unit, FAO/IAEA, Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency's Laboratories Division, Seibersdorf, Austria:

sendo o ELISA-c1¹⁴ constituído de lipopolissacarídeo liso (sLPS) de *B. abortus* cepa 1119-3, anticorpo monoclonal (M84) e no conjugado um anticorpo goat antimouse IgG (H+L) (Jackson) e o ELISA-c2¹⁵ um kit comercial). Os resultados para a SAR, AAT, ELISA-I1, ELISA-I2 e ELISA-c2 foram, respectivamente, sensibilidade (79,28%; 91,42%; 98,57%; 97,14% e 100%) e especificidade (86,33%; 94%; 97,33%; 95,66% e 99,33%).

Em um experimento cujo objetivo era comparar, usando como referência a FC, a eficiência dos testes imunológicos ELISA-I e AAT no diagnóstico da brucelose bovina, foram utilizadas 303 fêmeas bovinas divididas em dois grupos, não vacinadas (207) e vacinadas (96), entre 3 a 8 meses de idade com a dose padrão da vacina B19, foram avaliadas. Nesse estudo, o teste ELISA-I e o AAT apresentaram sensibilidade de 100% para os dois grupos. No grupo dos animais não vacinados, a especificidade para o ELISA-I e o AAT foram iguais a 81% e 95,5%, respectivamente, enquanto que para o grupo dos animais vacinados os valores encontrados foram 16,8% e 98,9%, respectivamente (JARDIM et al., 2009)

Com a finalidade de verificar a o desempenho do AAT e do ELISA-I¹⁶, bem como a relação entre estes testes para o diagnóstico da brucelose bovina, Paulin et al. (2009) realizaram um estudo utilizando 200 fêmeas bovinas adultas da raça nelore provenientes de duas propriedades situadas na região de Araçatuba, estado de São Paulo. Todos os animais foram vacinados com a vacina B19 quando aos 3 a 8 meses de idade. O grupo A foi composto por 100 fêmeas reagentes ao AAT e o Grupo B composto por 100 fêmeas não reagentes ao AAT por mais de dois anos. Considerando FC como padrão ouro, o AAT e o ELISA-I apresentaram sensibilidade iguais a 100% e 95%; e especificidade iguais a 83,33% e 84,17%, indicando que tanto o AAT quanto o ELISA-I podem ser utilizados para teste de triagem.

Em estudo realizado com 696 fêmeas búfalas da raça murrh provenientes da região do Vale do Ribeira, São Paulo, em que foi avaliado o desempenho de três testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*B. abortus*, o ELISA-I apresentou sensibilidade e especificidade iguais a 57,4% e 70,45%, respectivamente. Nesse estudo, a associação entre o 2-ME e a FC foi tido como padrão. De acordo com os autores, a baixa performance do ELISA-I possivelmente deveu-se ao fato de que o conjugado utilizado, o qual foi feito com anti anticorpo policlonal de bovinos (PAULIN et al., 2012).

Com a finalidade de diminuir o impacto negativo da brucelose na saúde humana e animal e promover a competitividade da pecuária nacional, MAPA, por meio do PNCEBT,

¹⁴ Fornecido pela FAO/IAEA

¹⁵ Svanova, *Brucella abortus*, C-ELISA

¹⁶ Ceditest® *B. abortus*, Institute for Animal Science and Health

instituiu a vacinação obrigatória contra a brucelose bovina em fêmeas de três a oito meses de idade, em todo território nacional e o controle do trânsito de animais destinados à reprodução e adotou uma estratégia de adesão voluntária, de certificação de propriedades livres ou monitoradas, com o intuito de agregar valor aos seus produtos (BRASIL, 2006).

MATERIAL E MÉTODOS



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi conduzido em duas propriedades localizadas na Mesorregião Metropolitana de Belém, nos municípios de Castanhal e Santa Izabel do Pará e em três propriedades localizadas na Mesorregião do Nordeste Paraense, nos municípios de São Francisco do Pará, Garrafão do Norte e Capitão Poço (Figura 1), durante o período de março a maio de 2013.

Os animais utilizados no experimento eram mantidos em sistema extensivo de criação, em piquetes de pastagens cultivadas de *Brachiaria bizanta* cv Marandu (Braquiarião) e *Panicum maximum* (Mombaça). Todos os animais recebiam suplementação mineral e água ad libitum.

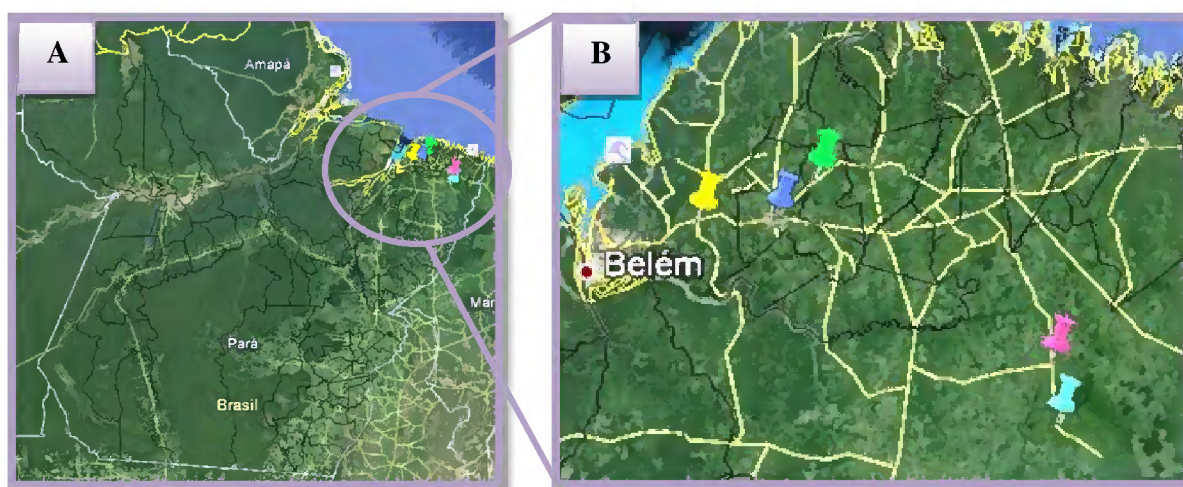


Figura 1 - A. Localização das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense; **B.** Municípios: Castanhal (alfinete azul), São Francisco do Pará (alfinete verde), Garrafão do Norte (alfinete azul claro), Santa Izabel do Pará (alfinete amarelo) e Capitão Poço (alfinete rosa) **Fonte:** Google Earth modificado.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Realizou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em que as 400 fêmeas bovinas incluídas no presente estudo eram zebuínas da raça nelore (*Bos taurus indicus*) com idade ≥ 24 meses (Quadro 2). Em todas as fazendas os animais eram vermifugados e

vacinados contra febre aftosa, carbúnculo sintomático e brucelose. Todas as propriedades apresentaram histórico de abortamento, porém de forma esporádica.

Quadro 2 - Caracterização dos locais do experimento e da amostragem em cada rebanho estudado, de acordo com a fazenda e o município.

Fazendas	Amostragem/rebanho (%)	Município
1	80/1.300 (6,15%)	Castanhal
2	80/600 (13,33%)	São Francisco do Pará
3	80/700 (11,42%)	Garrafão do Norte
4	80/2.500 (3,20%)	Santa Izabel
5	80/2.500 (3,20%)	Capitão Poço

3.3 COLHEITA DE SANGUE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram realizadas colheitas de amostras de sangue de 10mL de todos os animais por meio de punção da veia jugular externa, sem garroteamento excessivo do vaso, utilizando-se agulhas descartáveis de 25 x 0,8mm e tubos vacutainer siliconizados sem anticoagulantes, devidamente identificados.

A retração do coágulo ocorreu à temperatura ambiente e posteriormente ocorreu centrifugação por 15 minutos a uma velocidade de 3000G, sendo em seguida separadas por aspiração do soro, aliquotadas em microtubos tipo eppendorfs identificados, os quais foram acondicionados à -20 °C para posterior análise laboratorial (Figuras 2A e 2B).

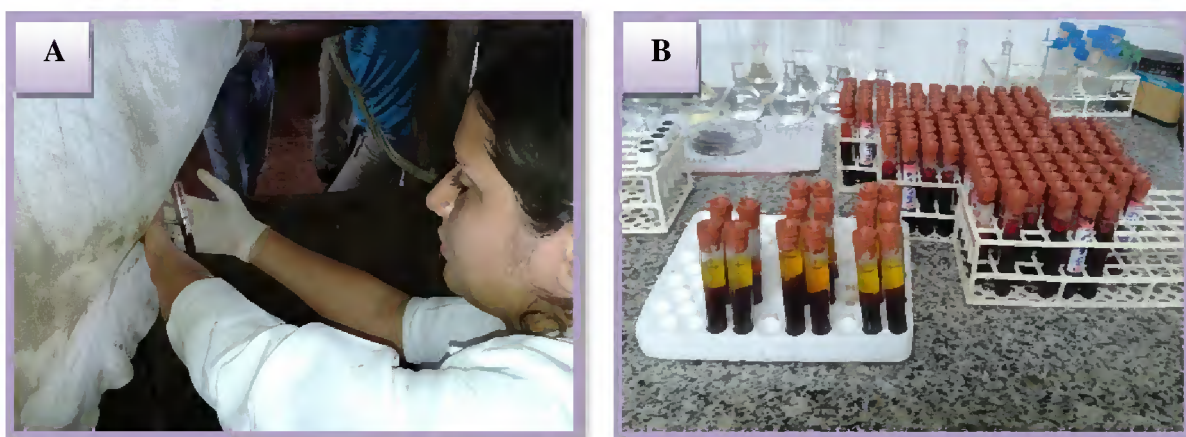


Figura 2 - A. Momento da colheita sanguínea; B. Amostras após centrifugação.

3.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADAS

3.4.1 Diarreia Viral Bovina

3.4.1.1 Vírusneutralização (VN)

A técnica de VN foi realizada no Laboratório de Virose de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo-SP, conforme descrito no Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2008), sendo os procedimentos de amplificação viral realizados em células de linhagem de rim bovino (MDBK - Madin Darby Bovine Kidney) livres de pestivírus. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1,6 mgL⁻¹), estreptomicina (0,4 mgL⁻¹) e nistatina (0,02 mgL⁻¹), suplementado com 10% de soro equino.

Para a análise dos títulos de anticorpos, foram empregadas placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato. A coluna um da placa teste foi destinada para o controle de células, a coluna dois para controle da toxicidade de cada soro e nas colunas três até doze, as amostras foram diluídas em série, na base logarítmica 2, a partir da diluição 1:10 até 1:5120, utilizando-se meio MEM e testadas em duplicata

Para validação da prova, foi incluído um pool de soros como controle negativo e positivo com títulos de anticorpos conhecidos. Feita a diluição das amostras, foi adicionada à placa 100 DICT50 do vírus (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares/cavidade) da cepa de BVDV citopática Singer, exceto no controle de células e de soro. Na placa controle, foi feito o controle de DICT50 (0,2; 2; 20 e 200 DICT50/mL), e outra placa de retrotitulação do mesmo vírus utilizado na diluição das doses infectantes.

As placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, receberam 50µl de suspensão de células MDBK na concentração de 3 x 10⁵ células/ml, em cada cavidade. A infectividade foi indicada pelo ECP visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido, após quatro dias de incubação a 37°C e 5% de CO₂. O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade em ambas as cavidades de cada diluição, sendo a menor diluição detectada pela prova igual a 1:10.

Tendo em vista que os soros foram analisados em duplicata, os títulos de anticorpos foram expressos como o inverso da diluição que inibiu o aparecimento de ECP nas duas

repetições e foram consideradas reagentes as amostras com título igual ou superior a 10. O teste foi validado através do controle de células, do controle de soros, do controle de doses, resultado dos soros controle e da retrotitulação, pelo método de Reed e Muench (1938).

3.4.1.2 ELISA indireto

Para a detecção de anticorpos contra o BVDV, utilizou-se um kit ELISA indireto, o Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antibody Test¹⁷. As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal Rural da Amazônia, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Após descongelamento das amostras (temperatura ambiente) e homogeneização, foram colocados em cada poço da placa de microtitulação 100 µl de solução diluente; em seguida foram adicionados 25 µl de controle negativo dos poços F12 e G12 e 25 µl de controle positivo nos poços D12 e E12; o poço H12 serviu como controle; e os demais poços foram preenchidos com 25 µl de cada amostra de soro bovino (Figura 3).

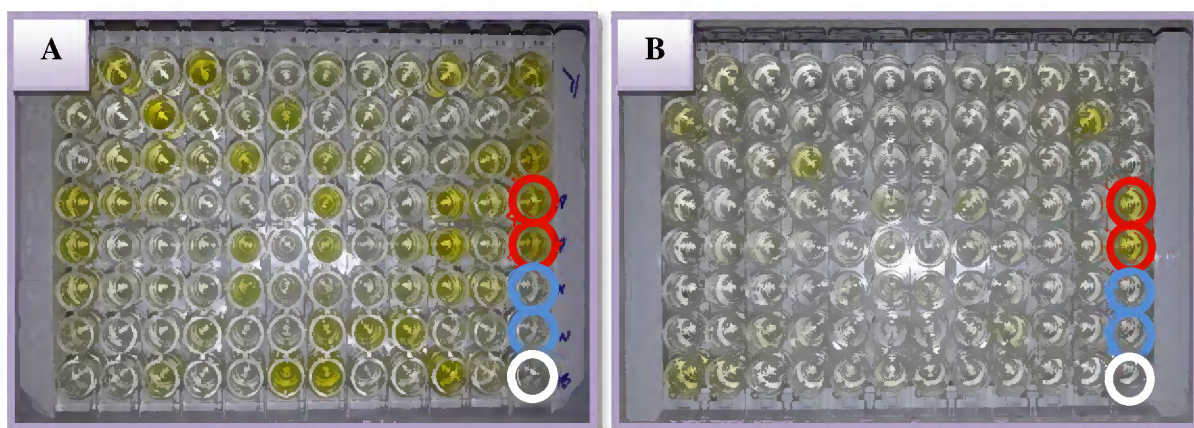


Figura 3 - A e B. Distribuição dos controles e amostras na placa. Tiras D12 e E12: controles positivos (vermelho); F12 e G12: controles negativos (azul); H12: controle padrão (branco).

Em seguida, o conteúdo das cavidades foi homogeneizado agitando-se levemente a placa, sendo posteriormente esta selada firmemente com um zip-lock a fim de evitar evaporação, para conseqüentemente ser incubada por 90 minutos à 18-26 °C .

¹⁷ IDEXX BVDV Total Ab Test Part Number: 06-44000-04 © 2013 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Após a incubação, os poços das placas foram aspirados e lavados com 300 µl de Solução de Lavagem por cinco vezes em uma lavadora automática¹⁸ para microplacas. Posteriormente, foram distribuídos 100 µl de conjugado em cada cavidade e novamente incubada por 30 minutos à 18-26 °C.

Seguida a incubação, aspiração e lavagem das placas, foram adicionados 100 µl de substrato em cada cavidade, e incubados por 10 minutos à 18-26 °C, seguidas de nova aspiração e lavagem. Ao final, foram adicionados 100 µl de solução de interrupção em cada cavidade para parar a reação. A leitura da placa foi realizada com absorvância de 450nm.

Os resultados de densidade óptica (D.O) fornecidos pela leitora¹⁹ foram anotados e utilizados pra calcular a validação do teste e posteriormente os resultados das amostras de acordo com as especificações do fabricante do kit de diagnóstico (Quadro 3).

Quadro 3 - Fórmulas utilizadas para calcular a validação do teste de diagnóstico do vírus da diarreia viral bovina e o resultado para interpretação das amostras.

Cálculo para validação dos diagnósticos do vírus da diarreia viral bovina	
Média do controle negativo	$CN_x = (CN1 + CN2)/2$
Média do controle positivo	$CP_x = (CP1 + CP2)/2$
Resultado das amostras (diagnóstico)	$A/P = (Amostra - CN_x)/CP_x - CN_x$
Validação do teste	$CP_x - CN_x \geq 0,150 // CN_x \leq 0,250$
Interpretação dos resultados	
$A/P < 0,200$	Negativo
$0,300 > A/P \geq 0,200$	Suspeitas
$A/P \geq 0,300$	Positivo

Fonte: Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antibody Test. IDEXX BVDV Total Ab Test Part Number: 06-44000-04 © 2013 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

¹⁸ Lavadora TP Washer Basic, REV-00, Thermoplate

¹⁹ Leitora de Microplacas TP Reader Basic, REV-00, Thermoplate

3.4.2 Brucelose Bovina

3.4.2.1 Teste de Fixação do Complemento (FC)

Foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por Alton et al. (1988), com antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3 para a prova de soroaglutinação em tubos. Todos os reagentes utilizados foram padronizados de acordo com a técnica acima citada.

O complemento consistiu de soro de cobaia, sendo empregadas 5 unidades hemolíticas 50%. O sistema hemolítico de suspensão de hemácias de carneiro, padronizada em espectrofotômetro para a concentração de hemoglobina de 0,95g/dl, acrescida de igual volume de uma suspensão de hemolisina, que consiste de anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro.

O teste, realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U”, consistiu em colocar 25 µl do soro a ser testado, inativado em banho-maria a 58°C por 30 minutos, em diluições duplas de 1:2 até 1:128; 25 µl de antígeno e 25 µl de complemento. Após agitação em agitador de microplacas, incubou-se em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram acrescentados 25 µl do sistema hemolítico, sendo a placa novamente agitada e o material incubado nas condições mencionadas acima com uma nova agitação após os primeiros 15 minutos. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos. A leitura foi realizada comparando com uma escala de hemólise, observando-se o grau de fixação de complemento, com base na quantidade de hemácias restantes e no aspecto do sobrenadante.

O resultado final do teste foi expresso em título, ou seja, a maior diluição do soro que apresentar pelo menos 25% de fixação de complemento. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram título maior ou igual a quatro.

Esta prova foi selecionada como referência para a comparação com as outras técnicas, pois é bastante acurada e de alta especificidade, além de apresenta melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, e permitir definir títulos sorológicos controversos pelas técnicas convencionais (MOLNÁR et al., 2002; BRASIL, 2006).

3.4.2.2 Antígeno Acidificado Tamponado

Esta prova foi realizada de acordo com as normas preconizadas pelo PNCEBT (BRASIL, 2006). Inicialmente, foi utilizado um preparado²⁰ com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa Bengala. Antes do início do teste, os soros e o antígeno foram equilibrados à temperatura ambiente.

Inicialmente, utilizou-se um micropipetador para dispensar 30 µl de soro por área da placa de vidro, em um ângulo 45°. Em seguida, depositou-se 30 µl de antígeno ao lado do soro, sem ser nele misturado. Com a ajuda de um misturador, antígeno e soro foram misturados com movimentos circulares.

Após mistura, a placa foi agitada continuamente por 4 minutos, com movimentos oscilatórios, numa frequência de, aproximadamente, 30 movimentos por minuto, de modo a permitir que a mistura soro-antígeno fluísse lentamente dentro de cada círculo. A leitura do teste foi feita após colocar a placa de vidro na caixa de leitura com luz indireta (Figura 4A). Foram consideradas positivas as reações que apresentaram a formação de grumos (Figura 4B).

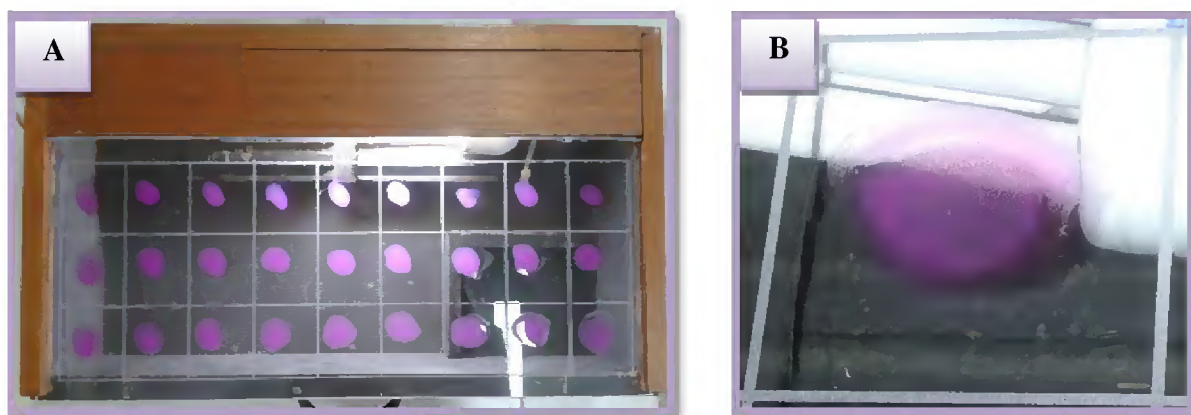


Figura 4 - A. Momento da leitura do teste do antígeno acidificado tamponado; **B.** Amostra com formação de grumos, evidenciando resultado positivo.

3.4.2.3 ELISA indireto

Para a detecção de anticorpos contra a brucelose, utilizou-se um kit ELISA indireto, o *Brucella abortus* Antibody Test²¹. As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia

²⁰ Antígeno Acidificado Tamponado - TECPAR.

²¹ IDEXX Chekit Brucellose Serum 06-40639-01 © 2013 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

e Microbiologia da Universidade Federal Rural da Amazônia, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Após descongelamento das amostras (temperatura ambiente) e homogeneização, foram colocados em cada poço da placa de microtitulação 90 µl de solução de lavagem; em seguida foram adicionados 10 µl de controle negativo dos poços F12 e G12 e 25 µl de controle positivo nos poços D12 e E12; o poço H12 serviu como controle; e os demais poços foram preenchidos com 10 µl de cada amostra de soro bovino. Em seguida, o conteúdo das cavidades foram homogeneizados agitando-se levemente a placa, sendo posteriormente esta selada firmemente com um zip-lock e incubada por 60 minutos à 37 °C em câmara úmida.

Após a incubação, os poços das placas foram aspirados e lavados com 300 µl de Solução de Lavagem por três vezes em uma lavadora automática para microplacas. Posteriormente, foram distribuídos 100 µl de Conjugado Anti-IgG Ruminante-PO em cada cavidade e novamente coberta e incubada por 60 minutos à 37 °C em câmara úmida.

Seguida a incubação, aspiração e lavagem das placas, foram adicionados 100 µl de substrato em cada cavidade, e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Ao final, foram adicionados 100 µl de solução de interrupção em cada cavidade para parar a reação. A leitura da placa foi realizada com comprimento de onda de 450nm. Os resultados de densidade óptica (DO) fornecidos pela leitora foram anotados e utilizados pra calcular a validação do teste e posteriormente os resultados das amostras de acordo com as especificações do fabricante do kit de diagnóstico (Quadro 4).

Quadro 4 - Fórmulas utilizadas para calcular a validação do teste de diagnóstico da brucelose bovina e o resultado para interpretação das amostras.

Cálculo para validação dos diagnósticos da Brucelose bovina	
Controle Positivo	DOpositivo – Donegativo
Amostra	DOamostra – Donegativo
Fórmula para diagnóstico	Valor(%) = (DOamostra - DOneg)/DOpos - DOneg) x 100
Validação do teste	DOpos < 2,000 // DOneg < 0,500 // DOpos - DOneg ≥ 0,300
Interpretação dos resultados	
Valor < 80%	Negativo
Valor > 80%	Positivo

Fonte: *Brucella abortus* Antibody Test. IDEXX Chekit Brucellose Serum 06-40639-01 © 2013 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados verificados foram classificados como diagnóstico positivo correto (a), diagnóstico positivo incorreto (b), diagnóstico negativo correto (c), diagnóstico negativo incorreto (d). A partir desses valores foram calculados de cada método a sensibilidade $[(a/a + d) \times 100]$, a especificidade $[(c/c + b) \times 100]$, o valor preditivo positivo $[(a/a + b) \times 100]$ e o valor preditivo negativo $[(c/c + d) \times 100]$, conforme descrito por Karen et al. (2011). O teste Qui quadrado foi utilizado para comparar as sensibilidades e especificidades dos métodos de diagnósticos: ELISA-I e AAT.

A estatística descritiva dos dados, representada pelas frequências (%) de animais positivos ou negativos, tanto entre os exames como entre as diferentes fazendas (1, 2, 3, 4 e 5), foi obtida pelo procedimento Freq do programa SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

A estatística de inferência foi realizada como análise de variância (ANOVA), por meio do procedimento de análises mistas Glimmix, do programa SAS. Tendo em vista que os exames sempre foram realizados no mesmo animal, um modelo estatístico para avaliar efeito de exame foi constituído pelas variáveis classificatórias EXAME e ANIMAL. O efeito FAZENDA e a interação entre o tipo de exame realizado dentro de cada fazenda (EXAME*FAZENDA) também foi realizada em uma segunda análise. Como a causa de variação IDADE não foi especificamente controlada (animais adultos), esta foi incluída no modelo somente como variável aleatória (random). A comparação entre as frequências dos grupos foi realizada por meio do teste de médias Least Square Means (LSMeans) do SAS. Foi utilizado o nível de significância de 5%.

As amostras que se apresentaram suspeitas frente ao ELISA-I para BVDV foram contabilizadas como positivas nos cálculos supramencionados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIARREIA VIRAL BOVINA

A VN, método escolhido como padrão por ser considerada uma técnica altamente específica (OIE, 2008), detectou a presença de 39,25% (157/400) de animais soropositivos para o BVDV (Tabela 2). Esses dados diferem significativamente dos 54,50% (218/400) de amostras reagentes obtidas pela técnica do ELISA-I. Para os cálculos de desempenho dos testes, as amostras consideradas suspeitas no ELISA-I (22/400 - 5,5%) foram contabilizadas como positivas.

Tabela 2 - Resultados dos testes de virusneutralização e ELISA BVDV Total Ab Test para a detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em amostras de soro sanguíneo.

RESULTADOS	TESTES	
	VN (%)	ELISA BVDV Total Ab Test (%)
Animais positivos	39,25 ^b (157/400)	54,50 ^a (218/400)
Animais negativos	60,75 ^b (243/400)	45,50 ^a (182/400)
TOTAL	100 (400/400)	100 (400/400)

Letras minúsculas distintas apresentam diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre colunas.

De acordo com a VN, a prevalência de animais soropositivos apresentou-se menor do que a encontrada por Junqueira et al. (2006). Esses autores, também utilizaram a mesma técnica em 208 fêmeas bovinas (nelore e red angus x nelore) em idade reprodutiva, provenientes da região oeste do estado de São Paulo, encontrando uma prevalência igual a 98% (204/208). O ponto de corte utilizado no estudo foi de titulação ≥ 8 , ou seja, menor do que o utilizado no presente estudo (≥ 10). A metodologia adotada pode ter colaborado para a divergência nos resultados. Os autores também observaram que dos animais positivos 11,6% apresentaram títulos de anticorpos ≥ 128 , podendo sugerir infecção aguda e/ou a presença de animais PI no rebanho em questão (JUNQUEIRA et al., 2006).

Considerando ainda apenas os resultados obtidos pela VN, estes também se mostram menores do que os 66,3% (1150/1734) de animais soropositivos encontrados por Quincozes et al. (2007), em diferentes municípios do estado do Rio Grande do Sul; assim como aos 64% (2261/3533) de animais reagentes encontrados por Brito et al. (2010) em diferentes regiões do estado de Goiás. O ponto de corte em ambos os estudos foi baseado na detecção de títulos de anticorpos ≥ 4 . Adicionalmente, os animais eram provenientes de exploração leiteira ou de corte, com vários tipos de manejo e sistemas de produção, tamanhos, raças e produtividades.

Dias et al. (2010), pesquisaram a prevalência de anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2 em 1925 amostras de soro sanguíneo obtidas de rebanhos naturalmente infectados e não vacinados contra o BVDV, oriundas de diversas regiões de São Paulo com variados sistemas de produção, exploração e manejo. Os autores encontraram uma prevalência de 62,8% de animais reagentes aos dois genótipos, 2,65% reagiram apenas contra o BVDV-1 e 3,5% apenas ao BVDV-2. Esses resultados evidenciam a disseminação dos dois genótipos nos rebanhos sendo, portanto, de fundamental importância a inclusão de ambos nos testes de VN realizados pelos laboratórios brasileiros, bem como a utilização de cepas de isolados brasileiros, haja vista que ocorre uma grande variabilidade antigênica (DUBOVI, 2013) em relação a cepas norte-americanas e europeias do BVDV (DIAS et al., 2010).

Ao teste de VN, Fino et al. (2013), avaliando bovinos da raça crioula langeana criados em sistema extensivo, sem vacinação contra a BVDV e usando sistema de monta natural, criados em diversas regiões de Santa Catarina, encontraram 58,25% de animais soropositivos. Esses resultados comprovam ainda mais a prevalência do agente em várias regiões do país. Possivelmente, a divergência encontrada entre os estudos esteja relacionada ao quantitativo de animais amostrados, bem como pode sofrer interferência entre as raças, necessitando de mais estudos que comprovem ou não se esta constitui uma variável de risco para a prevalência-do agente.

Considerando o teste ELISA-I para a detecção da prevalência de animais soropositivos para a BVDV, Mineo et al. (2006) estudaram dois rebanhos leiteiros, com manejos de ordenha e reprodutivo diferentes, porém ambos não faziam uso da vacinação contra o BVDV. De acordo com os autores, a prevalência média encontrada foi de 58,43%. Este resultado foi similar aos 61,5% encontrado por Chaves et al. (2010) ao analisarem 400 fêmeas leiteiras com sinais clínicos ou não da doença, provenientes da região amazônica maranhense. Os animais também não eram vacinados contra a BVDV, evidenciando uma infecção natural. As pesquisas sorológicas apresentam prevalência pelo ELISA-I maiores do que a encontrada

nesse estudo. Entretanto, todos os valores estão de acordo com as estimativas de prevalência de anticorpos contra BVDV na população bovina, que varia de 50 a 90% (HOUE, 1999). Contudo, é importante salientar que o tipo de exploração, assim como o manejo, pode influenciar a prevalência da infecção, uma vez que os dados obtidos em rebanhos leiteiros mostraram-se superiores ao encontrado em gado de corte.

Sousa et al. (2013), ao estudarem 156 animais provenientes de rebanhos bovinos leiteiros criados em sistema de produção semi-intensivo em São Luis/MA, identificaram uma prevalência de 67,3% de animais reagentes e 5,14% de animais suspeitos, por meio do ELISA-I (BVDV Total Ab Test - IDEXX Laboratories). Os animais estudados eram fêmeas bovinas mestiças de girolanda, não vacinadas contra a BVD. Quando confrontados com os dados obtidos no presente estudo, estes resultados mostram um percentual mais elevado. Os autores destacaram que animais com produção de leite de 1 a 5 litros/dia/vaca se mostraram como fator risco associado à soropositividade. Variáveis como ordenha manual e ausência de assistência veterinária podem ter contribuído para a infecção.

Sturza (2011) analisou o soro de 701 amostras submetidas ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (SV/UFSM) para diagnóstico sorológico e encontrou prevalência de 63,1% de animais reagentes e 6,4% de amostras suspeitas. Não houve discriminação de raça, sexo ou idade, bem como não foram fornecidas informações quanto ao tipo de exploração pecuária e condições de manejo nos quais os animais eram criados. Para diagnóstico, também foi utilizado o kit BVDV Total Ab Test (IDEXX Laboratories).

Os resultados encontrados por todos os autores citados anteriormente apresentam um percentual maior de animais soropositivos. Provavelmente, fatores como manejo e tipo de exploração podem influenciar na frequência de anticorpos encontrados, pois de acordo com os dados apresentados, a prevalência mostrou-se maior em rebanhos leiteiros, possivelmente pelo fato da vida útil do animal ser maior do que em explorações de corte. Ainda, deve-se considerar o número de animais testados e as técnicas de amostragem utilizadas.

Um estudo realizado por Freitas et al. (2011) no município de Açailândia-MA, com 91 amostras de fêmeas bovinas mestiças da raça Nelore provenientes de quatro propriedades que apresentavam características semelhantes, como a prática extensiva de criação, condições de manejo e nutrição em comum e ausência de histórico de vacinação contra o BVDV, foram observadas uma frequência de 37,37% de animais reagentes e 18,68% de animais suspeitos.

Esses resultados, embora menores, corroboram como o presente estudo quanto a menor prevalência da infecção em gado de corte, provavelmente devido o tempo de

permanência dos animais nas propriedades e, conseqüentemente, a exposição de animais susceptíveis ao contato direto com o animal infectado. Cabe ressaltar ainda que a diferença de frequência encontrada pode também estar relacionada com o número de animais testados na população bovina estudada.

Observando o comportamento dos testes diagnósticos em relação à propriedade estudada, verifica-se que há diferença altamente significativa ($p < 0.0001$) entre os resultados encontrados para cada propriedade. Contudo, não há diferença entre a interação propriedade x teste, mostrando que tanto a VN como o ELISA-I apresentaram comportamento diferente entre as fazendas, porém semelhantes na mesma propriedade (Tabela 3).

Tabela 3 - Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina nas diferentes propriedades estudadas, de acordo com o teste utilizado.

FAZENDA	TESTES	
	VN (%)	BVDV Total Ab Test (%)
1	13,75 ^c (11/80)	32,50 ^c (26/80)
2	15,00 ^c (12/80)	25,00 ^c (20/80)
3	80,00 ^a (64/80)	81,25 ^a (65/80)
4	0,00 ^d (0/80)	17,50 ^d (14/80)
5	87,50 ^b (70/80)	88,75 ^b (71/80)

Letras minúsculas distintas na mesma linha apresentam diferença significativa entre si ($p < 0,0001$)

Um rebanho para ser considerado positivo necessita de apenas um animal soropositivo para o vírus. Portanto, o presente estudo mostrou que, pela técnica da VN, o BVDV encontra-se disseminado nas fazendas da Mesorregião Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense, com prevalência de 80% entre os rebanhos estudados e com prevalência de animais reagentes que varia de 0,00% a 87,50%, enquanto que pela técnica do ELISA-I, a prevalência nos rebanhos foi igual a 100% e a prevalência entre os animais variou de 17,50% à 88,75%.

As diferentes prevalências de anticorpos contra o BVDV apresentadas nos estudos anteriormente citados enfatiza a hipótese de que este vírus encontra-se amplamente disseminado em diversas regiões do Brasil, com diferentes situações epidemiológicas sendo, portanto, necessário um estudo mais sistemático e padronizado (FLORES et al., 2005) . No entanto, também funcionam como um alerta para a implantação de medidas que visem à prevenção e ao controle da infecção nas regiões estudadas.

Em relação à presença de anticorpos anti-BVDV, no presente estudo, os dois testes concordam em 38,75% das amostras testadas (valor positivo correto), e em 45,00% das amostras como não reagentes (valor negativo correto) ao BVD. Entretanto, o ELISA-I apresentou 15,75% de amostras falso positivos e 0,50% de amostras falso negativas (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado do BVDV Total Ab Test frente à virusneutralização em bovinos de corte da raça nelore, criados no estado do Pará.

VN	ELISA BVDV Total Ab Test		TOTAL
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Positivos (%)	38,75 (155/400)	0,50 (2/400)	39,25 (157/400)
Negativos (%)	15,75 (63/400)	45,00 (180/400)	60,75 (243/400)
TOTAL	54,50 (218/400)	45,50 (182/400)	100,00 (400/400)

Quanto à sensibilidade e a especificidade, o ELISA-I apresentou resultados iguais a 98,72% e 74,07%, respectivamente. Na tabela 5, estão apresentados os resultados dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo para o BVDV Total Ab Test frente à VN.

Os resultados de sensibilidade e especificidade do BVDV Total Ab Test no presente estudo corroboram àqueles descritos por Zarkov e Jarullah (2012) ao citarem sensibilidade de 93,75% e especificidade de 76,92% em bovinos leiteiros com infecção natural pelo vírus.

Tabela 5 - Sensibilidade (%), especificidade (%), valor preditivo positivo (%) e valor preditivo negativo (%) do ELISA BVDV Total Ab Test.

	ELISA BVDV Total Ab Test
Sensibilidade (%)	98,72
Especificidade (%)	74,07
Valor Preditivo Positivo (%)	71,10
Valor Preditivo Negativo (%)	98,90

Quanto à especificidade pressupõe-se que, nesta pesquisa, esse valor pode ter sido baixo devido ter sido usada somente a cepa BVDV-1 (Singer) no teste da VN, enquanto que o ELISA-I pode possuir a capacidade de detectar anticorpos anti-BVDV-2.

Este pressuposto pode ser confirmado por meio do estudo realizado por Gonda et al. (2012), com objetivo de estimar a correlação entre um kit comercial de ELISA-I como substituto ao teste de VN para a detecção de anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2 em bezerros vacinados intramuscular (n=96) e intranasal (n=97) contra a BVDV. Nesse estudo, os autores não avaliaram a sensibilidade e a especificidade do ELISA-I como variáveis para determinar a escolha do diagnóstico, mas avaliaram a correlação entre a detecção de anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-1 com a VN pelo BVDV-1 e BVDV-2, respectivamente, a qual se apresentou alta para o primeiro e moderada para o segundo.

Larska et al. (2013) também compararam o desempenho de dois kits comerciais de ELISA-I (BVDV-Ab ELISA kit - Svanova Biotech, Uppsala; e BVDV Total Ab Test - IDEXX, Liebefeld-Bern, Switzerland, Sweden) na detecção de anticorpos contra o BVDV-1 e BVDV-2, em amostras sanguíneas de vitelos experimentalmente infectados com o BVDV-1 e com uma cepa atípica de pestivírus. Esses autores apresentaram resultados, para o kit 1 e kit 2, de sensibilidade e especificidade iguais a 98,1% e 80,7% e 90,4% e 88,6%, respectivamente.

Esses dados são semelhantes aos resultados do presente experimento com bovinos naturalmente infectados pelo BVDV, o que enfatiza a possibilidade de existir animais reagentes à anticorpos anti-BVDV-2 no rebanho estudado. Ainda, de acordo com o fabricante do kit, o ensaio apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2, o que provavelmente explica os 12,17% de amostras falso positivas. Diante disso, há uma necessidade de um maior número de estudos sobre a

prevalência dessa doença no estado do Pará, bem como a verificação da presença de cepas atípicas de pestivírus disseminadas pelo rebanho paraense.

Como subsídio maior para essa hipótese foi obtido, neste experimento, um valor preditivo positivo igual a 71,10%, indicando que o teste foi capaz de detectar animais positivos para o BVDV-1 quando eles realmente o são e um valor preditivo negativo de 98,90%, o que expressa a capacidade do ELISA-I em identificar animais negativos quando eles realmente não apresentam o vírus.

No Brasil, um estudo similar foi desenvolvido por Sturza (2011), onde foram analisadas 701 amostras de soro bovino pelo Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul (SV/UFSM) para verificar a ocorrência de anticorpos anti-BVDV, por meio da comparação entre as técnicas de ELISA-I e VN. Entretanto, nesse estudo, o ELISA-I foi tomado como prova padrão apresentando, dessa forma, sensibilidade e especificidade iguais a 100%. Na análise comparativa entre os testes, o autor observou, para a VN, sensibilidade igual a 76,8%, especificidade 99,5%, valor preditivo positivo 97,8% e valor preditivo negativo de 93,5%.

Somente para título de comparação, ao analisarmos os dados obtidos por Sturza (2011) tomando a VN como padrão ouro, o ELISA-I (BVDV Total Ab Test) apresenta sensibilidade igual a 72,44%, especificidade de 64,44%, valor preditivo positivo igual a 92,76% e valor preditivo negativo igual a 27,10%. Dessa forma, esses dados diferem dos resultados obtidos na presente pesquisa. Eventualmente ocasionado, também, devido na VN ter sido utilizada somente a cepa de BVDV citopática Singer, promovendo um resultado falso positivo em 4,9% das amostras testadas, haja vista que há a hipótese do ELISA-I utilizado possuir a capacidade de identificar anticorpos anti-BVDV-2. Outro fator determinante para as condições encontradas estão relacionadas com a utilização de amostras provenientes de diversas regiões do Brasil e sem histórico prévio de vacinação dos animais.

No presente estudo, observou-se que 25,25% de amostras apresentaram na VN título de anticorpos ≥ 80 (Tabela 6). De acordo com Sturza (2011), isso demonstra a presença e identificação de animais PI nos rebanhos, sendo indicado adotar medidas que visem descartar esses animais com a intenção de diminuir e, posteriormente, eliminar uma fonte contínua de disseminação do vírus. Ressalta-se, ainda, que o ELISA-I apresentou resultado positivo para todas as amostras com título de anticorpos ≥ 80 .

Tabela 6 - Distribuição dos títulos de anticorpos no teste de vírusneutralização e a respectiva densidade óptica (DO) das amostras de soro pelo ELISA BVDV Total Ab Test.

VN (TÍTULO)	ELISA BVDV Total Ab Test (DO)		TOTAL
	< 0,200 ¹ (%)	≥ 0,300 ² (%)	
< 10	180 (45,00)	63 (15,75)	243 (60,75)
≥ 10	1 (0,25)	9 (2,25)	10 (2,50)
≥ 20	1 (0,25)	19 (4,75)	20 (5,00)
≥ 40	0	26 (6,50)	26 (6,50)
≥ 80	0	42 (10,50)	42 (10,50)
≥ 160	0	27 (6,75)	27 (6,75)
≥ 320	0	21 (5,25)	21 (5,25)
≥ 640	0	07 (1,75)	07 (1,75)
≥ 1280	0	02 (0,50)	02 (0,50)
≥ 2560	0	02 (0,50)	02 (0,50)
TOTAL	182 (45,5)	218 (54,50)	400 (100)

¹Amostras negativas; ² amostras positivas.

Ainda, a análise da tabela permite inferir que dos 39,25% (157/400) de animais soropositivos pela VN, o ELISA-I foi capaz de identificar 38,75% (155/400) desses animais apresentando, dessa forma, eficiência em detectar amostras com títulos de anticorpos ≥10, corroborando a hipótese de sua utilização como um bom teste de triagem.

4.2 BRUCELOSE BOVINA

A FC, método escolhido como padrão por ser considerado teste conclusivo (BRASIL, 2006), detectou a presença de 5,00% (20/400) de animais soropositivos para a brucelose, resultado este similar aos 4,5% (18/400) encontrados pelo AAT. Todavia, esses valores foram significativamente menores daqueles obtidos pelo ELISA-I. (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados dos testes de fixação do complemento, ELISA Chekit Brucellose Serum e antígeno acidificado tamponado para a detecção de anticorpos contra a *Brucella abortus* em amostras de soro bovino.

	EXAME		
	FC (%)	ELISA Chekit Brucellose Serum (%)	AAT (%)
Animais positivos	5,00 ^b (20/400)	23,75 ^a (95/400)	4,50 ^b (18/400)
Animais negativos	95,00 ^b (380/400)	76,25 ^a (305/400)	95,50 ^b (382/400)
TOTAL	100 (400/400)	100 (400/400)	100 (400/400)

Letras minúsculas distintas apresentam diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre colunas.

As prevalências obtidas no presente estudo pelas técnicas de FC e ATT são similares às aquelas descritas por Dias (2004), Villar (2008), Ogata (2009) e Silva (2008), os quais encontraram resultados iguais a 3,81%; 6,22%; 4,43% e 3,36% para os estados de São Paulo, Rondônia, Tocantins e Sergipe, respectivamente, os quais trabalharam com bovinos e bubalinos, de ambos os sexos, provenientes de exploração leiteira ou de corte, com vários tipos de manejo e sistemas de produção, tamanhos, raças e produtividades. Nesses inquéritos sorológicos, o AAT foi empregado como triagem e o 2-ME como confirmatório para os animais positivos ao primeiro teste.

Confrontando esses resultados com os obtidos na presente pesquisa, observou-se que a prevalência de animais soropositivos foi inferior ao encontrado em Rondônia e superior ao encontrado nos demais estados. Essas diferenças podem ser explicadas pela quantidade de animais utilizados na pesquisa, a qual se mostrou inferior em comparação com a população estudada nos demais trabalhos e, possivelmente, pela metodologia aplicada, considerando

apenas fêmeas bovinas nelore em idade reprodutiva com histórico vacinal contra brucelose. Apesar desses fatores, atentou-se para o fato de que há uma disseminação da brucelose em todo o país e que esta se comporta de maneira diferente em cada região, levando em consideração o nível de tecnificação, manejo sanitário, diferença entre as raças e explorações de aptidão (Dias, 2004; BRASIL, 2006; Silva, 2008; Villar, 2008; Ogata, 2009).

Minervino et al. (2011) usando também o AAT como técnica diagnóstica da brucelose bovina no Pará, encontraram uma prevalência de 10,25% (792/7724) ao averiguar dados de três laboratórios credenciados no estado. Cabe ressaltar que foram analisados animais de diferentes raças, de ambos os sexos, com idade ≥ 24 meses, com e sem histórico de vacinação, fatores esses que podem ter interferido nos diferentes valores encontrados.

Além disso, os autores distribuíram a prevalência da doença em relação à mesorregião onde se encontravam as propriedades rurais estudadas, verificando valores relativamente similares entre as regiões Nordeste (9,9%), Sudeste (12,3%) e Sudoeste (14,2%) do estado, destacando-se apenas a região do Baixo Amazonas, com uma prevalência inferior (3,4%) às demais. Os autores justificaram que esse dado não reflete a realidade do Baixo Amazonas, uma vez que parte dos animais submetidos ao exame eram provenientes de rebanhos de elite. Dessa forma, evidenciam-se diferentes situações epidemiológicas da brucelose bovina nas diferentes regiões de um mesmo estado e que essas diferenças estão intrinsecamente relacionadas com os tipos de exploração pecuária e práticas de manejo sanitário adotadas.

Em relação à presença de anticorpos anti-*B. abortus*, no presente estudo, o ELISA-I concorda com a FC em 3,75% das amostras testadas (valor positivo correto) e em 75% das amostras como não reagentes (valor negativo correto). Entretanto, esse mesmo teste mostrou 20% de resultados falso-positivos e 1,25% falso-negativos (Tabela 8). Quanto ao AAT, os resultados positivos corretos, negativos corretos, falso-positivos e falso-negativos foram respectivamente iguais a 2,25%, 92,75%, 2,25% e 2,75% (Tabela 9).

Na análise da sensibilidade e especificidade do ELISA-I e do AAT, os resultados encontrados foram de 75% e 78,95% e 45% e 97,63%, respectivamente (Tabela 10). O teste qui quadrado tem a característica de ser altamente rigoroso para número pequeno de informações. Dessa forma, o ELISA-I e o AAT não apresentaram diferença entre si quanto a sensibilidade. Contudo, evidenciou-se diferença significativa entre o ELISA-I e o AAT quanto à especificidade. É importante ressaltar que a sensibilidade e especificidade dos testes são influenciadas pelos resultados falso negativos e falso positivos, respectivamente.

Tabela 8 - Resultado do ELISA Chekit Brucellose Serum frente à fixação do complemento em bovinos de corte da raça nelore, criados no estado do Pará.

FC	ELISA Chekit Brucellose Serum		TOTAL
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Positivos (%)	3,75 (15/400)	1,25 (5/400)	5,00 (20/400)
Negativos (%)	20,00 (80/400)	75,00 (300/400)	95,00 (380/400)
TOTAL	23,75 (95/400)	76,25 (305/400)	100,00 (400/400)

Tabela 9 - Resultado do antígeno acidificado tamponado frente à fixação do complemento em bovinos de corte da raça nelore, criados no estado do Pará.

FC	AAT		TOTAL
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Positivos (%)	2,25 (9/400)	2,75 (11/400)	5,00 (20/400)
Negativos (%)	2,25 (9/400)	92,75 (371/400)	95,00 (380/400)
TOTAL	4,50 (18/400)	95,50 (382/400)	100,00 (400/400)

Tabela 10 - Sensibilidade (%), especificidade (%), valor preditivo positivo (%) e valor preditivo negativo (%), do ELISA Chekit Brucellose Serum e antígeno acidificado tamponado, associados ao resultado da fixação do complemento.

	ELISA Chekit Brucellose Serum	AAT
Sensibilidade (%)	75,00 ^b	45,00 ^b
Especificidade (%)	78,95 ^b	97,63 ^a
Valor Preditivo Positivo (%)	14,29 ^c	50,00 ^b
Valor Preditivo Negativo (%)	98,36 ^a	97,12 ^b

Letras minúsculas distintas apresentam diferenças altamente significativas entre colunas (p<0,0001)

Os resultados de sensibilidade e especificidade do Chekit Brucellose Serum no presente estudo são divergentes daqueles descritos por Molnár et al. (2002), ao citarem sensibilidade de 98,57% e especificidade de 97,3% para um teste de ELISA-I o qual era composto por um conjugado antibovino de cadeia leve (anticorpo monoclonal) e 96,13% de sensibilidade e 95,66% de especificidade para outro teste imunoenzimático indireto contendo conjugado contra IgG total bovino, semelhante ao do presente experimento. Ainda, o AAT apresentou sensibilidade de 91,42% e especificidade de 94%. As diferenças encontradas entre os testes, possivelmente, podem estar relacionadas ao ELISA-c utilizado como padrão ouro, bem como o ponto de corte recomendado pelo fabricante do ELISA-I (1:200). Somado a isso, podem existir diferenças em relação à espécie estudada pelos autores (bubalina), bem como à procedência das amostras sanguíneas analisadas (soros de rebanhos livres, com prevalência baixa, média e alta da infecção).

Observou-se que, nesta pesquisa, a especificidade do ELISA-I foi influenciada pelos 20% de resultados falso positivos encontrados quando comparados a técnica de FC. Nesse contexto, pressupõe-se que a vacinação contra a brucelose nesses animais pode ter sido realizada acima de 8 meses de idade, provocando uma resposta humoral prolongada e, conseqüentemente, os níveis de IgG1 permanecem altos e inalterados, podendo gerar reações falso positivos nos testes indiretos de diagnóstico (BRASIL, 2006).

Quando o diagnóstico indireto é realizado em populações de baixa prevalência, deve ser utilizado um teste de especificidade próxima a 100% e, se não houver uma única técnica com essa característica, poderão ser usadas duas provas em sequência: a primeira de triagem, com boa sensibilidade, para detectar animais reagentes, os quais são submetidos a novo teste para diagnóstico confirmatório, que deverá apresentar alta especificidade (JARDIM et al., 2009). A realização de técnicas em sequência para o diagnóstico confirmatório dos indivíduos positivos em teste de triagem aumenta a especificidade do procedimento diagnóstico e diminui o número de resultados falso-positivos (BRASIL, 2006).

No ELISA-I foi encontrado valor preditivo positivo igual a 14,29% e valor preditivo negativo de 98,36%, enquanto que no AAT esses valores foram de 50% e 97,12%, respectivamente (Tabela 10). O valor preditivo positivo é a proporção de animais positivos que realmente estão infectados e o valor preditivo negativo é a proporção de animais com resultados negativos que não estão infectados, sendo ambas determinadas pelos valores de sensibilidade e especificidade do teste em função da condição epidemiológica da doença na população em questão.

Logo, quando a prevalência da enfermidade é inferior a 10%, o valor preditivo negativo de um teste de sensibilidade apenas moderada é muito alto, e tende a aumentar na medida em que a prevalência da doença diminui. O valor preditivo positivo segue trajetória inversa, sendo muito baixo quando a prevalência é inferior a 10%, diminuindo na medida em que a prevalência da doença também diminui (JARDIM et al., 2009).

Dessa forma, ambos os testes tiveram capacidades similares em identificar animais negativos quando estes realmente o são. Entretanto, foi observado diferença altamente significativa na comparação do valor preditivo positivo entre os testes, tendo o ELISA-I obtido valor igual a 14,29% em virtude, principalmente, dos 20% de amostras falso positivas encontradas, o que enfatiza a utilização de duas técnicas sorológicas em sequência, com a finalidade de aumentar a especificidade do diagnóstico.

Jardim et al. (2009) com o objetivo de avaliar a eficiência de um teste de ELISA-I, o compararam com a FC (tida como padrão), AAT e 2-ME com SAL. A sensibilidade dos testes de ELISA-I e do AAT tanto para fêmeas bovinas vacinadas quanto para não vacinadas correspondeu a 100%, enquanto que a especificidade de animais não vacinados foi de 81% e 95,5% e dos vacinados de 16,8% e 98,9% para o ELISA-I e AAT, respectivamente.

Resultados similares também foram encontrados por Paulin et al. (2009) em fêmeas bovinas adultas da raça Nelore vacinadas contra a brucelose. Esses autores também consideraram a FC como técnica padrão e encontraram, dessa forma, sensibilidade iguais a 95% e 100% e especificidade de 84,17% e 83,33% para o ELISA-I e o AAT, respectivamente.

Esses dados são discordantes dos encontrados no presente estudo. Possivelmente, características como manejo sanitário, vacinação no período adequado e medidas que visem diminuir a prevalência da infecção nos rebanhos exercem influência sobre os resultados dos testes. Entretanto, independente do estudo observado, sugere-se que a técnica do ELISA-I não deva ser utilizada como prova de diagnóstico confirmatório definitivo da brucelose em rebanhos vacinados, uma vez que favorecem o diagnóstico falso-positivo.

Ainda, Paulin et al. (2012) avaliando um teste de ELISA-I em fêmeas búfalas da raça murreh, encontraram sensibilidade de 57,4% e especificidade de 70,45%, valores estes atribuídos ao fato da utilização de um conjugado policlonal de bovinos, indicando que estes testes tendem a ser espécie-específicos.

Sanogo et al. (2013) avaliaram o desempenho do teste AAT e um ELISA-I no diagnóstico de brucelose em amostras de soro sanguíneo de bovinos zebuínos oriundos da Costa do Marfim. Para tanto, utilizaram uma abordagem bayesiana para estimar a

sensibilidade e especificidade de cada teste. O estudo mostrou que o AAT e o ELISA-I apresentaram sensibilidade e especificidade respectivamente iguais a 54,9% e 96,1%; e 97,7% e 95,0%. A brucelose expressou prevalência igual a 4,6% nessa região.

Os dados de sensibilidade e especificidade do AAT, assim como o resultado da prevalência da doença são similares aos obtidos nesta pesquisa. Todavia, estranha-se o fato da sensibilidade do AAT ser baixa, uma vez que este é tido como teste de triagem mais indicado pelo PNCEBT (BRASIL, 2006).

Dessa forma, supõe-se que amostras com infecções antigas, ou seja, que se infectaram com o agente há vários anos antes da realização da prova (MOLNÁR et al., 2002), possam apresentar uma titulação de anticorpos baixa, a qual o AAT, possivelmente, não seja capaz de identificar. Quanto ao ELISA-I, o teste apresentou bom parâmetro de desempenho, o que viabiliza sua capacidade de identificar anticorpos anti *B. abortus*.

De um modo geral, os resultados referentes à sensibilidade e especificidade do ELISA-I encontrados no presente estudo são inferiores aos apontados na literatura, provavelmente devido à interferência de fatores como: tipos de exploração pecuária, raça, condições de manejo e vacinação de bezerras em idade vacinal ao final da recomendada. Entretanto, cabe ressaltar que o ELISA-I, quando aliado a outra prova sorológica como o AAT (orientado pelo PNCEBT), mostrou-se passível de ser utilizado como teste de triagem.

Quando observamos o comportamento dos testes diagnósticos em relação a propriedade estudada, verifica-se que há diferença altamente significativa ($p < 0.0001$) entre os resultados encontrados para cada propriedade em cada teste. Ainda, há interação entre propriedade x teste, o que nos leva a inferir que tanto o ELISA-I quanto o AAT apresentaram comportamento diferente entre as fazendas estudadas e dentro de uma mesma fazenda (Tabela 11), ressaltando ainda mais que as condições de manejo podem interferir nos resultados de ambos os testes.

Um rebanho para ser considerado positivo necessita de apenas um animal sororreagente para a brucelose. Portanto, o presente estudo mostrou que esta infecção encontra-se disseminada em todas as propriedades estudadas, com prevalência de animais soropositivos variando de 1,25% a 6,25%, encontrados pela técnica de FC.

Tabela 11 - Prevalência da infecção pela *Brucella abortus* nas diferentes propriedades estudadas, de acordo com o teste utilizado.

FAZENDA	EXAME		
	FC (%)	ELISA Chekit Brucellose Serum (%)	AAT (%)
1	6,25 ^{ef} (5/80)	32,50 ^{ab} (26/80)	13,75 ^{de} (11/80)
2	1,25 ^f (1/80)	36,25 ^a (29/80)	2,50 ^f (2/80)
3	10,0 ^{ef} (8/80)	26,25 ^{bc} (21/80)	3,75 ^f (3/80)
4	1,25 ^f (1/80)	2,50 ^f (2/80)	1,25 ^f (1/80)
5	6,25 ^{ef} (5/80)	21,25 ^{cd} (17/80)	1,25 ^f (1/80)

Letras minúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,0001$) entre si (linhas e colunas).

CONCLUSÕES



5 CONCLUSÕES

Após realização do presente estudo foi possível inferir que:

- A prevalência da infecção pelo BVDV em vacas nelore criadas na Mesorregião Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense, pela VN (padrão ouro), foi igual a 39,25%, considerada abaixo da média nacional. Entretanto, esse valor sugere a necessidade de implantação de medidas preventivas e de controle da infecção;
- O kit de ELISA-I (Idexx BVDV Total Ab, IDEXX Laboratories) mostrou-se como uma alternativa para a detecção de anticorpos contra o BVDV em soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados, uma vez que apresentou alta sensibilidade (98,72%) e boa especificidade (74,07%), além de valores preditivo positivo e preditivo negativo dentro do esperado, frente ao teste de VN;
- De acordo com o fabricante, o kit apresenta sensibilidade e especificidade para detectar anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2, o que possivelmente explica os 12,17% de amostras com resultados falso positivos, uma vez que na VN utilizou-se somente a cepa Singer (BVDV-1).;
- A utilização do kit ELISA-I para o diagnóstico do BVDV apresentou fácil execução e interpretação, proporcionando resultados em menor tempo hábil, além de um diagnóstico soroepidemiológico seguro, com identificação de animais PI, podendo ser utilizado como teste de triagem;
- A utilização do kit ELISA-I como teste padrão sugere a diminuição da variação entre laboratórios, proporcionada pelas diferentes estirpes utilizadas no teste de VN;
- A prevalência da infecção pela *Brucella abortus* em vacas Nelore criadas na Mesorregião Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense, pela FC (padrão ouro), foi igual a 5,0%, considerada abaixo da média nacional.

- O kit de ELISA-I (IDEXX Chekit Brucellose serum, IDEXX Laboratories) apresentou sensibilidade e especificidade iguais a 75,00% e 78,95%, respectivamente, podendo representar um recurso útil na triagem, quando utilizado em conjunto com o AAT, proporcionando um resultado rápido e seguro devido aumento da especificidade do procedimento diagnóstico.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3rd ed. Washington: D.C.: Organización Panamericana de la Salud, v.1, 2001.
- ALTAMIRANDA, E.A.G.; KAISERB, G.G.; WEBERD, N.; LEUNDAC, M.R.; PECORAE, A.; MALACARIE, D.A.; MORÁNA, O.; CAMPEROC, C.M.; ODEÓN, A.C. Clinical and reproductive consequences of using BVDV-contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. *Animal Reproduction Science*, v. 133, p. 146– 152, 2012.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA. Anuário Brasileiro da Pecuária. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 128p, 2012.
- BACHOFEN, C., BRAUN, U., HILBE, M., EHRENPERGER, F., STALDER, H., PETERHANS, E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea of diferente genetic subgrupus. *Veterinary Microbiology*, v. 141, p. 258–267, 2010.
- BAKER, J.A.; YORK, C.J.; GILLEPSIE, J.H.; MITCHELL, G.B. Virus diarrhea in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v.15, n.57, p. 525-531, 1954.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Veterinary Clinical of North America*, v.11, p.425–445, 1995.
- BRASIL. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 2006.
- BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T.; CAIXETA, S.P.M.B.; RIBEIRO, A.C.C.; MIRANDA, T.M.T.; BARBOSA, A.C.V.C.; BARTHASSON, D.L.; LINHARES, D.C.; FARIA, B.O. Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no esta do de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 39, p. 7-19, 2010.
- BRÜLISAUER, F.; LEWIS, F.I.; GANSER, A.G.; MCKENDRICK, I.J.; GUNN, G.J. The prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in beef suckler herds in Scotland. *The Veterinary Journal*, v.186, p.226–231, 2010.
- CHAVES, N.P.; BEZERRA, D.C.; SOUSA, V.E.; SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense, Brasil. *Ciência Rural*, v. 40, p. 1448-1451, 2010.
- DIAS, F.C.; ALEXANDRINO, B.; MEDEIROS, A.S.R.; PEREIRA, G.T.; OLIVEIRA, M.C.; SAMARAI, S.I. Comparação dos testes de virusneutralização contra os genótipos 1 e 2 do

vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) em bovinos de rebanhos naturalmente infectados. *Ciência Rural*, v. 40, p. 913-920, 2010.

DIAS, R.A. Caracterização especial da brucelose bovina no estado de São Paulo. - Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004.

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

FINO, T.C.M.; MELO, C.B.; RAMOS, A.F.; MCMANUS, C.; LEITE, R.C.; MARTINS, E. Occurrence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in Crioula Lageana cattle. *Journal of Animal Science*, v.3, n.4, p.165-170, 2013.

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

FREITAS, F.A.D.; CAVALCANTI, M.L.; MARQUES, A.S.C.; MESQUITA, F.P.N.; AMORIM, A.S.; LEITE, A.I. Prevalência de brucelose em bovinos na região do Potengi, estado do Rio Grande do Norte. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 2, p. 118-122, 2008.

FREITAS, E.J.P.; LOPES, C.E.R.; SANTOS, T.C.C.; FONSECA, S.C.C.; SOARES, R.R.; MOURA FILHO, J.M.; SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M. Detecção de anticorpos contra o BVDV (vírus da diarreia viral bovina) em rebanhos de corte não vacinados no município de Açailândia, Maranhão-Brasil. *Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.18, 2011.

FULTON, R.W.; CONFER, A.W.W.; BURGE, L.J. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus- 1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza- 3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. *Vaccine*, v.13, p.725–733, 1995.

FULTON, R.W.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; D’OFFAY, J.M.; BOLIN, S.R.; MAES, R.K.; BAKER, J.C.; FREY, M.L. Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhoea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 4, p.380– 383, 1997.

FULTON, R.W., WHITLEY, E.M., JOHNSON, B.J., RIDPATH, J.F., KAPIL, S., BURGE, L.J., COOK, B.J., CONFER, A.W., Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.73, p.283–291, 2009.

FULTON, R.W. Host response to bovine viral diarrhoea virus and interactions with infectious agents in the feedlot and breeding herd. *Biologicals*, v. 41, p.31-38, 2013.

FUNDO DE DESENVOLVIMENTO DA PECUÁRIA DO ESTADO DO PARÁ - FUNDEPEC. Índices pecuários do estado do Pará, 2011.

GAROUSI, M.T.; HAGHPARAST, A.; ESTAJEE, H. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies among the industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran. *Tropical Animal Health and Production*, v. 41, p. 663-667, 2009.

GAROUSI, M.T.; MEHRZADB, J. Effect of bovine viral diarrhoea virus biotypes on adherence of sperm to oocytes during in-vitro fertilization in cattle. *Theriogenology*, v.75 , p.1067–1075, 2011.

GHODASARA, S.N.; ROY, A.; BHANDERI, B.B. Comparison of Rose Bengal Plate Agglutination, Standard tube agglutination and Indirect ELISA tests for detection of *Brucella* antibodies in Cows and Buffaloes. *Veterinary World*, v.3, n.2, p.61-64, 2010.

GONDA, M.G.; FANGA, X.; PERRYA, G.A.; MALTECCAB, C. Measuring bovine viral diarrhoea virus vaccine response: Using a commercially available ELISA as a surrogate for serum neutralization assays. *Vaccine*, v. 30, p. 6559– 6563, 2012.

GOYAL, S.M. Diagnosis. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. Iowa: Blackwell Publishing Professional, p. 197-208, 2005.

GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. *Bovine Viral Diarrhoea Virus*. 1ed. Victoria: Wiley-Blackwell, 272p., 2008.

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

GUARINO, H.; NUÑEZ, A.; REPISO, M.V.; DARGATZ, D.A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 85, p 34-40, 2008.

HANDEL, I.G.; WILLOUGHBY, K.; LAND, F.; KOTERWAS, B.; MORGAN, K.L.; TANYA, V.N.; BRONSVOORT, B.M. Seroepidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in the Adamawa Region of Cameroon and use of the SPOT test to identify herds with PI calves. *PLOS ONE*, v. 6, p. 11, 2011.

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

HUGUET, C.T.; DELGADO, A.; CALLE, S.; GONZÁLEZ, A. Cuantificación de *Brucella* sp. en bovinos de la Provincia de Canta, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, v.16, n., p.158-162, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE 2012. Produção da pecuária municipal 2011. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatística/economia/ppm. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

ISLAM, M.R.U.; GUPTA, M.P.; SIDHU1, P.K.; FILIA, G. Comparative evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay, rose bengal plate test, microagglutination test,

and polymerase chain reaction for diagnosis of brucellosis in buffaloes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v.37, p. 306-310, 2013.

JARDIM, G.C.; PIRES, P.P.; MATHIAS, L.A.; KUCHEMUCK, M.R.G.; Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado. *Agrarian*, v. 2, p. 131-142, 2009.

JUNQUEIRA, J.R.C.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 27, p. 471-480, 2006.

KALAYCIOGLU, A. T. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination: a review. *Veterinary Quarterly*. v. 29, p. 60-67, 2007.

KAUD, H.A.; ZAKI, M.M.; EL-DAHSHAN, A.R.; NASR, S.A. Epidemiology of Brucellosis Among Farm Animals. *Nature and Science*, v.8, n.5, 2010.

KAREN, A.M., DARWISH, S., RAMOUN, A., TAWFEEK, K., HANH, N.V., SOUSA, N.M., SULON, J., SZANCI, O., BECKERS, J.F. Accuracy of transrectal palpation for early pregnancy diagnosis in Egyptian buffaloes. *Tropical Animal Health Production*. v. 43, p. 5–7, 2011.

KZAM, A.S.L. ; MONTEIRO, B.M ; FAVA, C. ; FLORENZANO, F.P ; REZENDE, M. L. G. ; VIANA, R.B . Infecção natural pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos de corte criados no estado do Pará. In: 59ª Reunião Anual da SBPC,. Anais da 59ª Reunião Anual da SBPC, Belém, 2007.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, p. 202-212, 2008.

LARSKA, M.; POLAK, M.P.; LIUC, L.; ALENIUSA, S. Comparison of the performance of five different immunoassays to detect specific antibodies against emerging atypical bovine pestivirus. *Journal of Virological Methods*, v. 187, p. 103– 109, 2013.

LEE, D.H.; PARK, S.W.; CHOI, E.W.; LEE, C.W. Investigation of the prevalence of bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in South Korea. *Veterinary Record*, v. 162, p. 211-213, 2008.

LINDBERG, A.; BROWNLIE, J.; GUNN, G.J.; HOUE, H.; MOENNIG, V.; SAATKAMP, H.W.; SANDVIK, T.; VALLE, P.S. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, v. 25, p. 961-979, 2006.

LOPES, L.B.; NICOLINO, R.; HADDAD, J.P.A. Brucellosis - Risk Factors and Prevalence: A Review. *The Open Veterinary Science Journal*, v.4, p.72-84, 2010.

MACHADO, G. Vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em rebanhos leiteiros: um estudo de caso controle pareado e estratégias de construção de modelos. - Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MAHECHA, O.L.F.; CASTELLS, M.L.O.; COMBESSIES, G.; LAVORIAN, M.A.; WILDAA, M.; MANSILLAA, F.C.; SEKIA, C.; GRIGERAA, P.R.; CAPOZZOA, A.V. Single dilution Avidity-Blocking ELISA as an alternative to the Bovine Viral Diarrhea Virus neutralization test. *Journal of Virological Methods*, n.175, p.228– 235, 2011.

MAJALI, A.M.; TALAFHA, A.Q.; ABABNEH, M.M. Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Jordan. *Journal of Veterinary Science*, v.10, n.1, p. 61-65, 2009.

MARVULO, M.F.V. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado do Rio Grande do Sul. - Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009.

MATHIAS, A.L.; RIET-CORREA, F. Brucelose bovina e equina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. Doenças de ruminantes e equídeos. v.1, ed.3, Santa Maria – RS, p.225-234, 2007.

MATHIAS, L.A.; CORBELLIN, L.G.; MAIA, L.; NASCIMENTO, K.F.; PAULIN, L.M.S. SAMARTINO, L.E.; SERQUEIRA, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; SOUZA, M.M.A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Ciência Rural*, v. 40, p. 2135-2140, 2010.

MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A. Uso da reação de fixação de complemento na confirmação de resultados positivos do teste do Antígeno acidificado tamponado para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Ars Veterinaria*, v. 25, p. 68-71, 2009.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. In: BERAN, G. W.; STEELE, J. H. *Handbook of zoonoses*. 2. ed. Boca Raton. CRC Press: p.9-39.1994.

MINEO, T.W.; ALENIUS, S.; NÄSLUND, K.; MONTASSIER, H.J.; BJÖRKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, p. 188-192, 2006.

MINERVINO, A. H. H., CALHAU, A. S., ALVES FILHO, A., BARBOSA, R.S., NEVES, K. A. L., BARROS, I. O., BARRETO, R. A., ORTOLANI, E. L. Estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos soro reagentes à brucelose no estado do Pará. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, p. 47-53, 2011.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 22 p. 41-44, 2002.

MOTA, A.L.A.A. Fatores de risco para a brucelose bovina no Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

NEGREIROS, R.L. Caracterização da brucelose bovina no estado do Mato Grosso. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

NISKANEN, R.; ALENIOUS, S.; LARSSON, B. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Bovine Virus Diarrhoea in milk. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v.36, p.1-10, 2010.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. Bovine Viral Diarrhoea. Section 2.4, Chapter 2.4.8. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2012. c. 2, p. 698-711, 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. Bovine Brucellosis. Section 2.4, Chapter 2.4.3. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2012. c. 2, p. 1-35, 2009.

OGATA, R.A. Caracterização espacial da brucelose bovina no estado do Tocantins. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009.

OLINTO, F.A.; AZEVEDO, S.S.; JÚNIOR, J.R.S. Estudo retrospectivo da brucelose bovina na Microrregião de Pau dos Ferros, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Verde*, v.7, n.5, p.20-23, 2012.

OLIVEIRA, M.C.; ALEXANDRINO, B.; BORGES, L.A.; MEDEIROS, A.S.R.; AFFONSO, I.B.; DIAS, F.C.; SAMARA, S.I. Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em vacas gestantes abatidas no estado de São Paulo-Brasil. *Medicina Veterinária*, v.6, n.2, p.10-17, 2012.

PAULIN, L. M.; FERREIRA-NETO, J. S. O combate à brucelose bovina: situação brasileira. Funep, Jaboticabal, 154 p, 2003.

PAULIN, L.M.S.; ANDRADE-PACHECO, W.A.; CASTRO, V.; FEDERSONI, I.S.P. Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *brucella abortus* en bovinos. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v.76, n.1, p.9-15, 2009.

PAULIN, L.M.S.; SAMARTINO, L.E.; CONDE, S.B.; FEDERSONI, I.S.P.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S. Teste de polarização fluorescente, teste imunoenzimático competitivo (ELISA-C) e ELISA indireto para o sorodiagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Ciência Rural*, v.42, n.9, p.1621-1626, 2012

PETERHANS, E., BACHOFEN, C., STALDER, H., SCHWEIZER, M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, v. 41, 2010.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVESI, V.S.P.; LAGEI, A.P.; ROXO, E.; MOTAI, P.M.P.C.; MÜLLER, E.E.; FERREIRA NETO, J.S. Estudos de prevalência da brucelose no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de

Brucelose e Tuberculose: Introdução. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 6, p. 1-5, 2009.

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

RADOSTITS, O. M., GAY C. C., HINCHCLIFF, K. W., CONSTABLE, P. D. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007.

RAHMAN, A.K.M.A.; SAEGERMAN, C.; BERKVEN, D.; FRETIND, D.; GANI, O.; ERSHADUZZAMANE, AHMED, M.U.; EMMANUEL, E. Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of indirect ELISA, Rose Bengal Test and Slow Agglutination Test for the diagnosis of brucellosis in sheep and goats in Bangladesh. Preventive Veterinary Medicine, v.110, p.242– 252, 2013.

RAUE, R.; HARMEYER, S.S.; NANJIANI, I.A. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. The Veterinary Journal, v. 187, p. 330–334, 2011.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. The American Journal of Hygiene, v.27, n.3, 1938.

RIBEIRO, C.P. Avaliação da virusneutralização cruzada frente BVDV-1 e BVDV-2 no diagnóstico da diarreia viral bovina em animais naturalmente infectados. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. Virologia Veterinária, Santa Maria: UFSM, cap. 22, p.563-592, 2007.

RIDPATH, J.F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 26, p. 105–121, 2010.

RODNING, S.P.; GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D.; ZHANG, Y.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; HATHCOCK, T.L.; GARD, J.A.; PREVATT, J.W.; OWSLEY, W.F. Reproductive and economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus into a naive group of heifers. Theriogenology, v. 78, p. 1508–1516, 2012.

SAA, L.R.; PEREA, A.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS, A.J.; JARA, D.V.; RAMOS, R.; CARBONERO. Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. Tropical Animal Health Production, v. 44, p. 645-649, 2012.

SANOGO, M. THYS, E.; ACHI, Y.L.; FRETIN, D.; MICHEL, P.; ABATI, E.; BERKVEN, D.; SAEGERMAN, C. Bayesian estimation of the true prevalence, sensitivity

and specificity of the Rose Bengal and indirect ELISA tests in the diagnosis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, v.195, p.114–120, 2013.

SARRAZIN, S.; VELDHUIS, A.; MÉROC, E.; VANGEEL, I.; LAUREYNS, J.; DEWULF, J.; CAIJ, A.B.; PIEPERS, S.; HOOYBERGHS, J.; RIBBENS, S.; STEDE, Y.V.D. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 108, p. 28– 37, 2013.

SIKDER, S.; ANISUR RAHMAN, A.K.M.; FARUQUE, M.R.; ALIM, M.A.; DAS, S.; DAS GUPTA, A.; DAS, B.C.; UDDIN, M.I.; PRODHAN, M.A.M. Bovine Brucellosis: An Epidemiological Study at Chittagong, Bangladesh. *Pakistan Veterinary Journal*, v.32, n.4, p. 499-502, 2012.

SIKUSAWA, S. Prevalência e caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado de Santa Catarina. - Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004.

SILVA, F.L.; LESSA, F. Brucelose Bovina. *Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 46, p. 1-12, 2007.

SILVA, V.G.S.O. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Sergipe. - Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

SOUSA, V.E.; BEZERRA, D.C.; CHAVES, N.P.; SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (bvdv) e herpesvírus bovino tipo 1 (bohv-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.35, n.1, p.21-25, 2013.

STHAL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON WADMAN, A.; BAULE, C. Natural infection of cattle with an atypical ‘HoBi’-like pestivirus - Implications for BVD control and for the safety of biological products. *Veterinary Research*, v.38, n.3, p.517-523, 2007.

STURZA, D.A.F. Testes de ELISA e vírusneutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro e leite. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria/Centro de Ciências Rurais, 2011.

TAKIUCHI, E., ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. *Ciências Agrárias*, v. 22, p. 203-209, 2001.

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

THURMOND, M.C. Virus transmission. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control*. Iowa: Blackwell Publishing, cap.5, p.91-104, 2005.

TRANGADIA, B.J.; RANA, S.K.; NAGMANI, K.; SRINIVASAN, V.A. Serological Investigation of Bovine Brucellosis, Johne's Disease and Infectious Bovine Rhinotracheitis in Two States of India. *Journal of Advanced Veterinary Research*, v.2, p.38-41, 2012.

VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. Bases para a prevenção da brucelose animal. *Comunidade e Ciência/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP*, v. 11, n. 1, p. 25-36, 1987.

VIANA, K.F.; ZANINI, M.S. Perfil de produtores frente à vacinação contra doenças infecciosas abortivas em rebanhos bovinos do município de Alegre/ES. *Archives of Veterinary Science*, v.14, p. 103-108, 2009.

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

VILLAR, K.S. Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado de Rondônia. - Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

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

ZARKOV, I.V.; JARULLAH, B.A. Comparative evaluation of two tests to determine antibodies against mucosal disease-viral diarrhea. *Trakia Journal of Sciences*, v.10, n.3, p.53-57, 2012.