



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Suellen da Gama Barbosa Monger

Ocorrência de anticorpos contra os vírus da leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado do Pará

Belém
2014

Suellen da Gama Barbosa Monger

Ocorrência de anticorpos contra os vírus da leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado do Pará

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Pará - UFPA, Embrapa Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira

**Belém
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA

Monger, Suellen da Gama Barbosa

Ocorrência de anticorpos contra os vírus da leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado do Pará/ Suellen da Gama Barbosa Monger; orientador, Washington Luiz Assunção Pereira – Belém, PA, 2014.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

1. Búfalo – Doenças - Pará. 2. Leucose enzoótica bovina – Pará. 3. Diarreia viral bovina -Pará. I. Título

CDD – 22.ed. 636.089

Suellen da Gama Barbosa Monger

Ocorrência de anticorpos contra os vírus da leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado do Pará

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Pará - UFPA, Embrapa Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira
(Presidente e Orientador)
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias
(Membro Titular)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho
(Membro Titular)
Universidade Federal Rural da Amazônia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos alcançadas, pela força dada nos momentos difíceis.

Aos meus Pais Carlos Ernesto Barbosa Monger e Sebastiana da Gama Monger, minhas grandes referências, que me deram apoio, acreditaram no meu potencial e sempre me estimularam a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu incentivador e orientador Washington Luiz Assunção Pereira, pela dedicação a mim concedida, pela paciência, pelos ensinamentos, pelas críticas construtivas.

Ao amigo Alex Junior Souza de Souza, sem o qual esta dissertação não se tornaria realidade, por todo apoio, paciência, contatos realizados para execução do mesmo e pela hospitalidade.

Ao Marco Antônio de Oliveira Viana, amigo, companheiro, alguém que sempre pude contar.

Aos amigos do LABOPAT: Paulo Henrique Leal Bertolo, Ana Carolina Andrade Pereira, Bernard Salame Gemaque, Ana Cláudia Alexandre de Albuquerque, Leopoldo Augusto Moraes, Lucien Roberta Miranda de Aguirra, pela união, pelas risadas diárias, apoio psicológico e nas viagens relacionadas a esta pesquisa.

Aos Proprietários e trabalhadores das propriedades relacionadas a este estudo.

Ao Instituto biológico de São Paulo juntamente com a Dr^a Edviges Maristela Pituco, Michele dos Santos Lima e Adriana Hellmeister de Campos Nogueira pelos ensinamentos transmitidos, pelo auxílio na metodologia e processamento das amostras desta pesquisa.

Ao prof. Sebastião Tavares Rolim Filho, fundamental para as análises estatísticas, pela paciência e ensinamentos.

À prof^a Hilma Lúcia Tavares Dias, por sempre se mostrar disponível para esclarecer dúvidas sobre esta pesquisa.

Aos colegas Danilo do Rosário Pinheiro, Damazio Campos de Souza, Dionney Albuquerque da Costa, Antonio Soares Nascimento Junior, Maria Eduarda Bastos Andrade Moutinho da Conceição, Henry Manrique e Álvaro Chaves Neto que também contribuíram neste experimento.

Aos trabalhadores do Matadouro, pela ajuda e paciência nas coletas, em especial: os agentes de inspeção, o veterinário João e o Sr. Max.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Á todos que de alguma forma contribuíram para este estudo.

“Se você está percorrendo o caminho dos seus sonhos, comprometa-se com ele. Mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba que você pode fazer melhor do que está fazendo. Se você aceitar suas possibilidades no presente, com toda certeza vai melhorar no futuro, mas se nega suas limitações, jamais se verá livre deles. Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros e, sobretudo não se deixe paralisar pela sua própria crítica.”

Paulo Coelho

RESUMO

A leucose bovina, a diarreia viral bovina e a rinotraqueite infecciosa bovina estão entre as principais viroses que levam a perdas na produtividade e no desempenho reprodutivo de ruminantes. Embora bovinos e bubalinos sejam frequentemente criados em conjunto e apesar da comprovada ocorrência dessas enfermidades em bubalinos, trabalhos sobre ocorrência natural dessas viroses nessa espécie ainda são escassos. Deste modo, objetivou-se verificar a ocorrência de anticorpos contra os vírus da Leucose enzoótica bovina (LEB), Diarreia viral bovina (BVD) e Rinotraqueite infecciosa bovina (IBR) em bubalinos de criações localizadas nas Mesorregiões Nordeste Paraense, Metropolitana de Belém e do Marajó, no Estado do Pará, além de identificar os fatores de risco para a BVD em criações das Mesorregiões Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém. No presente estudo foram avaliados 350 soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) procedentes de propriedades agropecuárias localizadas nas respectivas mesorregiões, que foram submetidos às técnicas de sorologia: imunodifusão para LEB e soroneutralização para BVD e IBR. A frequência para as respectivas doenças na população de estudo foram: 0% (0/350), 53,71% (188/350) e 91,71% (321/350). Bubalinos machos e animais com idade mais avançada apresentaram maior soropositividade para BVD. A frequência de bubalinos sororreagentes para BVD foi maior na Mesorregião do Marajó, em relação às Mesorregiões Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém, enquanto para IBR foi maior nas Mesorregiões Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém. Dentre as variáveis investigadas, o tipo de ordenha foi o único identificado como fator de risco para a ocorrência da BVD em bubalinos.

Palavras-chave: bubalinos. Viroses. leucose enzoótica bovina. diarreia viral bovina. rinotraqueite infecciosa bovina. estado do Pará.

ABSTRACT

Bovine Leukosis, Bovine Viral Diarrhea and Infectious Bovine Rhinotracheitis are among the main viruses that lead to losses in productivity and reproductive performance of ruminants. Although cattle and buffalo are often created together, and despite the proven occurrence of these diseases in buffalo, papers about natural occurrence of these infections in this species are scarce. Thus, the objective of this study was to verify the occurrence of antibodies against the Bovine Leukosis Virus (BLV), Bovine Viral Diarrhea (BVD) and Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in buffalo creations located in the “Paraense” Northeast Mesoregion, Greater Metropolitan Belém and Marajó Mesoregion, Pará, in addition to identify the risk factors for BVD in creations located in “Paraense” Northeast Mesoregion and Greater Metropolitan Belém. In this study 350 buffaloes (*Bubalus bubalis*) sera were evaluated, coming from farms located in each mesoregion, that were subjected to serological techniques: immunodiffusion for (BLV) and serum neutralizing for BVD and IBR. Frequency of the respective diseases in the study population were: 0% (0/350), 53,71% (188/350) and 91,71% (321/350). Male buffaloes and older animals had higher seropositivity for BVD. The frequency of BVD seroreagents buffaloes was higher in Marajó Mesoregion compared to “Paraense” Northeast Mesoregion and Greater Metropolitan Belém, whereas for IBR the opposite occurred. Among the variables investigated, the type of milking was the only identified as a risk factor for the occurrence of BVD in buffaloes.

Keywords: buffaloes. viruses, enzootic bovine leukosis. bovine viral diarrhea. infectious bovine rhinotracheitis. Pará.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imunodifusão em gel de Ágar. **a:** Placa com soros de referência, soros testes e antígeno dispostas em poços. **b:** Placas incubadas dentro de câmara úmida, em temperatura ambiente. **c:** Leitura..... 35
- Figura 2 - a:** Placas para microneutralização de 96 cavidades. **b:** Estufa à 37°C com 5% de CO₂..... 37
- Figura 3 - A:** Efeito citopático ausente. **Ba:** Efeito citopático pelo BoHV-1 presente. **Bb:** Efeito citopático pelo VBVD presente..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras de bubalinos de acordo com a procedência.....	33
Tabela 2 - Frequência (%) de anticorpos contra vírus da leucose, vírus da diarreia viral e vírus da rinotraqueíte infecciosa em bubalinos criados no Estado do Pará.....	39
Tabela 3 - Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para diarreia viral bovina de acordo com a faixa etária em bubalinos criados no Estado do Pará.....	42
Tabela 4 - Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para diarreia viral bovina de acordo com o sexo em bubalinos criados no Estado do Pará.....	42
Tabela 5 - Frequência (%) de bubalinos reagentes e não reagentes para diarreia viral bovina de acordo com a procedência.....	43
Tabela 6 - Fatores de risco associados a soropositividade para BVD.....	44
Tabela 7 - Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para rinotraqueíte infecciosa bovina de acordo com a faixa etária em bubalinos criados no Estado do Pará.....	47
Tabela 8 - Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina de acordo com o sexo em bubalinos criados no Estado do Pará.....	48
Tabela 9 - Frequência (%) de bubalinos reagentes e não reagentes para rinotraqueíte infecciosa bovina de acordo com a procedência.....	48
Tabela 10 - Fatores de risco associados a soropositividade para IBR nas propriedades localizadas em Belém e Nordeste Paraense.....	49

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA.....	12
3.2 DIARRÉIA VIRAL BOVINA.....	19
3.3 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 COLHEITA DE AMOSTRAS.....	33
4.2 PROCESSAMENTO.....	34
4.2.1 Imunodifusão em gel de Agar	34
4.2.2 Soroneutralização	36
4.3 ANÁLISE DOS DADOS.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

A bubalinocultura vem crescendo no Brasil como uma alternativa rentável e saudável, uma vez que o búfalo tem como característica a rusticidade, maior resistência às enfermidades e parasitoses (NASCIMENTO; CARVALHO, 1993), é extremamente versátil, produz carne e leite nas mais variáveis condições climáticas (SILVA et al., 2003).

O efetivo de bubalinos em 2010 foi de 1,2 milhões de cabeças, registrando um aumento de 4,3% em relação ao ano anterior. A região Norte possui o maior rebanho do País, com destaque para o Estado do Pará, que possui 39% desse rebanho, sendo considerado o maior rebanho nacional (IBGE, 2010).

Embora a produção de búfalos seja uma alternativa promissora no mercado atual, as pesquisas acerca desta espécie ainda são incipientes, havendo uma grande carência de informações básicas necessárias para a aplicação de sistemas produtivos eficazes. Neste contexto, a saúde dos animais constitui um fator decisivo para o sucesso do desempenho produtivo desta espécie (FERREIRA et al., 2010).

Do ponto de vista da classificação zoológica, os búfalos pertencem à ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, família Bovidae, subfamília Bovinae, portanto apresentam semelhanças com os bovinos (ALBUQUERQUE et al., 2006). Como os sistemas de produção de bubalinos são semelhantes aos dos bovinos e já que possui estreita semelhança zoológica, os búfalos são susceptíveis a todas as doenças infecciosas e não infecciosas que acometem os bovinos (ADLAKHA; SHARMA, 1992; LEITE; BASTIANETTO, 2009).

Entre as principais causas de perdas na produtividade e no desempenho reprodutivo de bovinos encontram-se as infecções pelo vírus da leucose bovina (LBV), vírus da diarréia viral bovina (BVDV), herpesvírus bovino (BoHV) (FRANDOLOSO et al., 2008).

Embora bovinos e bubalinos sejam frequentemente criados em conjunto e apesar da comprovada ocorrência da leucose (MARIN et al., 1978; MOLNÁR et al., 2000; CHAVES et al., 2012a), da rinotraqueíte infecciosa (MAHMOUD; MAHMOUD; ALLAM, 2012) e da diarréia viral (CRAIG et al., 2008; MARTUCCIELLO et al., 2009), trabalhos da infecção natural dessas viroses na espécie bubalina ainda são escassos.

Além disso, no Estado do Pará, poucos têm sido os estudos relacionados à ocorrência dessas enfermidades nos rebanhos bubalinos. Deste modo, justifica-se a realização de estudos para estabelecer dados destas viroses na espécie na região.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a ocorrência de anticorpos contra os vírus da leucose, rinotraqueíte infecciosa e diarreia viral em bubalinos (*Bubalus bubalis*) de criações das Mesorregiões Nordeste Paraense, Metropolitana de Belém e do Marajó no Estado do Pará.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a ocorrência de anticorpos contra leucose, rinotraqueíte infecciosa e diarreia viral em bubalinos de acordo com sexo, idade e procedência;
- Identificar os fatores de risco para a diarreia viral bovina em criações de bubalinos localizadas nas Mesorregiões Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém.
- Identificar os fatores de risco para a rinotraqueíte infecciosa bovina em criações de bubalinos localizadas nas Mesorregiões Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

A leucose enzoótica bovina (LEB) é causada por um oncovírus de longo período de incubação denominado vírus da leucemia bovina (VLB) pertencente a subfamília Oncovirinae, família Retroviridae e gênero *Deltaretrovirus* (REBHUN, 2000; RADOSTITS et al., 2002; RAVAZZOLO; COSTA, 2007). Os vírus pertencentes a essa família são considerados mais resistentes aos raios ultravioletas, e radiações X por seu genoma diploide, sendo inativados por detergentes, solventes lipídicos como álcool, éter e clorofórmio, além de temperaturas elevadas: 56°C durante 30 minutos (FENNER; GIBBS; MURPHY, 2010).

O VLB possui no seu genoma um RNA de fita simples composto pelos genes *gag*, antígeno grupo específico responsável por codificar proteínas para o núcleo; *pol*, polimerase responsável pela transcriptase reversa e *env*, codificador de proteínas do envelope, além de genes acessórios *Tax* e *Rex* responsáveis por codificar proteínas reguladoras do genoma viral e fundamentais no processo de infecção do vírus (DERSE, 1987; RAVAZZOLO; COSTA, 2007, FENNER; GIBBS; MURPHY, 2010;).

O vírion do VLB apresenta formato esférico com 80 a 130 nm, o capsídeo apresenta simetria icosaédrica e possui envelope derivado da membrana celular do hospedeiro. Dentre as proteínas que o compõe, podem ser citada: a p24, antígeno interno (capsídeo) de maior concentração proteica; as glicoproteínas externas gp30 e gp51 encontradas no envelope viral, além da proteína gp51, responsável pela infecção viral (MOLTENI et al., 1996; MURPHY et al., 1999; FENNER; GIBBS; MURPHY, 2010).

Moratorio et al. (2010) realizaram análise filogenética utilizando gp51 com o objetivo de obter informações sobre o grau da variabilidade genética do VLB na região sul-americana, e observaram sete genótipos desse vírus nesta região.

A principal via de transmissão da doença é a horizontal através da exposição direta a fluídos biológicos contaminados com linfócitos infectados: sangue, sêmen, saliva, secreção nasal e traqueal (JOHNSON; KANEENE, 1992; REBHUN, 2000). A transmissão via hematogena ocorre por meio de práticas rotineiras de manejo como descorna, tatuagem (LUCAS et al., 1985), exame retal, cirurgias (HOPKINS et al., 1988), injeções parenterais (EVERMANN et al., 1986) incluindo transfusões sanguíneas, vacinações e teste de tuberculina (JOHNSON; KANEENE, 1992; BIRGEL JUNIOR et al., 1995; RADOSTITS et al., 2002).

De acordo com alguns autores, há possibilidade de transmissão por vetores. Dentre estes, o carrapato *Boophilus microplus*, e outros insetos hematófagos (ROMERO et al., 1984; MANET et al., 1989; PERINO et al., 1990), ácaros, helmintos (BIRGEL, 1982) e morcegos hematófagos (ROMERO et al., 1982).

Embora a transmissão vertical transplacentária e através da ingestão do colostro e do leite possuam importância na disseminação viral, ocorrem em menos de 10% das fêmeas infectadas (JOHNSON; KANEENE, 1992; BIRGEL JUNIOR et al., 1995). Hübner et al. (1997) observaram um índice de 4,8% de infecção congênita da leucose. Jacobsen et al. (1983) afirmam que a transmissão transplacentária do VLB só ocorre em vacas com alta concentração de vírus e baixo título de anticorpos, enquanto as vacas que apresentarem baixa concentração de vírus e alto título de anticorpos promovem transferência de imunidade para os fetos.

A leucose é uma doença de distribuição mundial com caráter endêmico em vários países (JOHNSON; KANEENE, 1992; RADOSTITS, 2002). Acomete principalmente os bovinos, embora haja relatos em ovinos, bubalinos e capivaras (BURNY et al., 1985; MOLNÁR et al., 2000; BASÍLIO et al., 2006; DEL FAVA et al., 2010; CHAVES et al., 2012).

Em relação às características dos rebanhos envolvidos deve-se ressaltar o tipo de produção, sendo os maiores índices encontrados em rebanhos leiteiros das raças Holandesa (D'ANGELINO, 1991; MELO et al., 1999) e Jersey (BIRGEL JUNIOR et al., 1995), enquanto menores valores são reportados nos rebanhos zebuínos da raça Nelore (BIRGEL et al. apud MATOS et al., 2005).

Deste modo, isso pode ser explicado pelo manejo constante na produção leiteira, propiciando a transmissão iatrogênica causada pelo uso de fômites contaminados (RHEBUN, 2000; RADOSTITS et al., 2002; BIRGEL JUNIOR et al., 2006). Portanto, os animais submetidos a um regime intensivo, com maior tecnologia, são mais susceptíveis que os criados de forma extensiva (TÁVORA; BIRGEL, 1991; FERNANDES et al., 2009).

A idade é outro fator determinante, visto que se observa aumento na prevalência da doença com o avançar da idade (BIRGEL JUNIOR et al., 1995; SPONCHIADO, 2008; BARROS FILHO et al., 2010), o que para Birguel Junior et al. (2006) não deve ser atribuído à maior susceptibilidade desses animais à infecção, mas sim, à maior permanência deles em contato com animais infectados e, conseqüentemente, estão mais sujeitos à infecção do que os animais jovens.

De acordo com Digiacom (1992) não há diferença entre os sexos, embora Birgel Júnior et al. (1995) tenha demonstrado taxa de infecção significativamente maior nas fêmeas, isto foi atribuído ao tipo de manejo e ao maior isolamento a que são submetidos os machos, nos rebanhos leiteiros.

A importação de bovinos sem testes prévios, a ausência de legislação e fiscalização efetiva em relação ao comércio de animais infectados oriundos dos Estados Unidos e da Europa foi fundamental para a disseminação do VLB na América do Sul (BRAGA, et al., 1998).

Deste modo, a LEB está disseminada em todo o rebanho brasileiro. Estudos da prevalência apontam distribuição variável da doença. Távora e Birgel (1991) projetam aproximadamente 37% de prevalência da infecção pelo VLB no Brasil. Para Birgel Junior et al. (2006), 27,6% dos bovinos criados em diversas regiões do Brasil estão afetados pela doença.

No Pará em amostras de soros sanguíneos oriundos de bovinos de diferentes raças, a prevalência observada foi de 49,8% (359/721) no ELISA e 26,0% (174/668) na Imunodifusão em Gel de Ágar - IDGA (MOLNÁR et al., 1999). Lima (1999) encontrou 70,81% (364/ 514) de prevalência em 31 rebanhos bovinos de 18 municípios do Pará pelo ELISA Indireto.

Ainda na região Norte, Carneiro et al. (2003) encontraram 9,6% (58/604) de prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados na Microrregião de Manaus, já Abreu et al. (1990) registraram prevalência de 9,7% (103/1060) em bovinos de corte, leite e misto no Acre e 23% (244/1060) em Rondônia.

Na região Nordeste, Matos, Birgel Júnior e Birgel (2005) referem um índice de 41% (326/796) na Bahia por ELISA, enquanto Távora e Birgel (1991) observaram 16,1% (174/1.084) pela IDGA; Santos (2010) encontrou no Maranhão, 53,80% (495/920) de bovinos leiteiros reagentes e Mendes et al. (2011) referiram 32,2% (213/662) em rebanhos leiteiros de Pernambuco.

Na região Centro-oeste, Andrade e Almeida (1991) registraram 35,9% (246/664) de animais reagentes em Goiás.

Na região Sudeste, 47,4% (618/1.193) dos animais da raça Holandesa, Nelore e mestiços no Estado de São Paulo foram reagentes para IDGA (MEGID et al., 2003). Em Minas Gerais, a prevalência foi de 28,4% (90/317) para mesma técnica sorológica (SANTOS et al., 1985).

Na região Sul, Barros Filho et al. (2010) observaram prevalência de 56,34% (151/268) em Curitiba no Paraná, enquanto Sponchiado (2008) encontrou 49,04% no mesmo estado. No

Rio Grande do Sul, 23,5% dos animais demonstraram-se reagentes (POLLETO et al., 2004) e em 172 municípios, Moraes et al. (1996), registraram 12% (1295/10357) de sororeagentes à LEB.

Após a introdução do vírus no organismo animal, ocorre interação entre os receptores da superfície da célula hospedeira, principalmente de linfócitos B, com as glicoproteínas gp30 e gp51 do envelope viral, e posterior integração do DNA viral ao DNA da célula infectada com a produção de novos vírions (LEUZZI JUNIOR; ALFIERI; ALFIERI, 2001; RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

A doença caracteriza-se por um curto período de viremia seguida por longo estágio latente em que o animal torna-se transmissor do vírus sem apresentar sinais clínicos e, após 10 a 12 dias, partículas virais estão presentes na corrente sanguínea induzindo uma resposta humoral contra as proteínas virais gp51 e p24 (PORTETELLE et al., 1978; MURPHY et al., 1999) ocorrendo soroconversão entre quatro a oito meses após o contágio (OLIVEIRA et al., 1997) ou até 24 meses (BIRGEL, 1982).

Estas proteínas induzem aumento dos níveis de IL2 que por sua vez estimula a proliferação de linfócitos CD4 enquanto a expressão do VLB retarda a apoptose fisiológica dos infectados, havendo alteração na função fagocítica de leucócitos circulantes (STONE; NORTON; DAVIS, 2000; AZEDO et al., 2008). Conseqüentemente, há proliferação linfocitária exagerada nos órgãos hemocitopoiéticos (linfonodos e baço), bem como em outros órgãos como abomaso, coração, rins, fígado e músculos (BIRGEL, 1982).

Os genes p53, bcl-2 e a proteína Tax parecem estar relacionadas com o processo linfosarcomatoso da doença (TAJIMA et al., 1998; TWIZERE et al., 2000). Por outro lado, a partir de estudo sobre o potencial oncogênico do VLB, Kerkhofs et al. (1998) concluíram que o gene G4 possui participação tanto *in vitro* como *in vivo*.

Em relação à permanência do vírus nos órgãos, sabe-se que na fase inicial há estabelecimento rápido da infecção no baço, e oito dias após esta fase, o vírus aparece nos leucócitos do sangue periférico (VAN DER MAATEN; MILLER, 1990).

Estudos demonstraram que os linfócitos B são as únicas células mononucleares do sangue periférico que são significativamente infectados com VLB, apresentando maior carga viral, entretanto, o vírus também possui tropismo por células epiteliais da glândula mamária (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ apud LIMA, 1999), pelos linfócitos T CD⁸⁺, monócitos e granulócitos (SCHWARTZ et al., 1994; MIRSKY et al., 1996).

Na leucose enzoótica pode ou não exibir sinais clínicos. Dentre as variadas manifestações, podem ser citadas a forma caracterizada por aumento crônico benigno de

linfócitos circulantes denominada linfocitose persistente, a multicêntrica de linfossarcomas ou ainda a forma aleucêmica. A ocorrência de uma ou outra forma no animal parece estar ligada à determinação genética (RADOSTITS et al., 2002; RIET-CORREA, 2007) .

Cerca de 30% dos animais infectados manifestam linfocitose persistente (LP) enquanto apenas 0,1 a 5% desenvolvem linfossarcomas, podendo ou não ter passado pelo estágio de linfocitose persistente. Entretanto, a maioria dos animais não manifesta clinicamente a doença, permanecendo como portadores assintomáticos (EVERMANN, 1992; MURPHY et al., 1999).

O aumento de volume dos linfonodos é o principal achado clínico, principalmente dos situados superficialmente (pré-escapulares e subilíacos) e viscerais (mesentéricos) que se apresentam firmes e indolores (RADOSTITS et al., 2002).

Entre os sinais clínicos da doença, também podem ser citados perda da condição corpórea, anorexia, diarreia, exoftalmia quando há infiltração neoplásica no tecido retrobulbar, quadro de insuficiência cardíaca com edema subcutâneo na região ventral, quando há envolvimento do coração, além de anemia, perdas reprodutivas quando de processo uterino, e quadro neurológico, quando há disfunção medular, caracterizado por incoordenação, paresia ou paralisia de membros posteriores (RADOSTITS, 2002; RIET-CORREA, 2007; BOABAID, 2011).

Na maioria dos casos, os bovinos acometidos apresentam queda na produção consequência de anorexia e diarreia que pode ser vista em forma de melena por comprometimento abomasal (RADOSTITS et al., 2002; RIET-CORREA, 2007; RAJÃO, 2008).

Em animais acometidos com a forma de linfossarcoma, são observados nódulos isolados ou coalescentes de coloração amarelo brancacentas infiltrando-se em diversos órgãos (MURPHY et al., 1999; RADOSTITS et al., 2002; BOABAID, 2011).

Fighera e Barros (2004) relataram caso de animal reagente para leucose com massa arredondada, macia, circunscrita, branco-rósea envolvendo os lobos parietal, temporal e occipital dos hemisférios cerebrais.

O linfossarcoma dos bovinos pode ser dividido em quatro formas: a do bezerro, denominada juvenil, a tímica, a cutânea e a multicêntrica. As formas juvenil, tímica e cutânea são classificadas como leucose esporádica dos bovinos e não existem dados que comprovem relação com agentes infecciosos (KLINTEVALL et al., 1993; PEIXOTO et al., 2010). Somente a forma adulta multicêntrica do linfossarcoma pode ser produzida pelo VLB (VAN DER MAATEN; MILLER, 1990).

A forma enzoótica, ou seja, o linfossarcoma multicêntrico ocorre de dois a cinco anos após a infecção (SILVA et al., 2008), sendo maior a ocorrência entre cinco e oito anos (BIRGEL, 1982).

Na histologia, nota-se proliferação de células linfocíticas morfológicamente atípicas com estroma escasso e infiltradas nos tecidos que podem estar arrançadas em dois padrões histológicos: difuso ou folicular (FRY; MCGAVIN, 2009).

O vírus produz regularmente tumores nos ovinos, raramente nos bovinos e excepcionalmente nos caprinos, não sendo verificada em suínos e coelhos (MERZA et al., 1989).

Em casos subagudos, os bovinos possuem boa condição corporal, entretanto morrem subitamente, o que, segundo Radostits et al. (2002), está relacionado à úlceras abomasal ou ruptura do baço pelo infiltrado tumoral com posterior hemorragia interna.

A doença pode predispor o animal a outras doenças pela imunodepressão causada, o que não é observado nos que manifestam a forma aleucêmica, pois não há redução dos níveis de anticorpos (OLIVEIRA et al., 2000; GARCIA et al., 2002).

Não existe possibilidade de cura para a LEB e seu prognóstico é ruim com desfecho letal (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Durante muito tempo, o diagnóstico era obtido através das manifestações da leucose persistente observadas pelo aumento crônico de linfócitos circulantes na leucometria (BIRGEL, 1982; RADOSTITS et al., 2002). Entretanto, como se descobriu que apenas uma parte dos bovinos infectados apresentam esse quadro, que pode ocorrer em período transitório e sofrer interferência devido à diversas causas, como outras enfermidades e devido ao surgimento de testes sorológicos, esta forma de diagnóstico caiu em desuso (EVERMANN, 1992; DEL FAVA et al., 1999; RIET-CORREA, 2007).

Portanto, o diagnóstico da LEB é baseado na detecção do agente através do isolamento viral e/ou detecção de antígenos virais, ou na demonstração da resposta imune ao vírus em testes sorológicos. Por outro lado, a doença na forma de linfossarcoma também é diagnosticada através de achados anatomopatológicos (RADOSTITS et al., 2002; RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

Entre os testes sorológicos, o mais utilizado é o teste de Imunodifusão em gel de Agar (IDGA), que por seu baixo custo, especificidade e praticidade, é considerado o teste de referência da Organização Internacional de Epizootias (OIE) além de ser o teste oficial de muitos governos para fins de certificação e controle do trânsito internacional de bovinos (EVERMANN, 1992; RADOSTITS et al., 2002; OIE, 2012).

Este método pode ser utilizado para amostras individuais de soro ou plasma sanguíneo, entretanto, não permite a pesquisa de anticorpos em amostras de leite, devido à perda de especificidade e sensibilidade (OIE, 2012).

Animais podem apresentar resultados falso-negativos ao teste de IDGA em duas situações: durante o período de incubação da doença, quando ainda não há níveis detectáveis de anticorpos ou no período pré e pós-parto, em que há mobilização de anticorpos do sangue para o colostro (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Por outro lado, resultados falso-positivos ocorrem em animais com idade inferior a sete meses devido a imunidade adquirida pela ingestão do colostro de vacas infectadas. Por isso o teste de IDGA não deve ser utilizado em animais com menos de três meses e em vacas no periparto (TYLER, 1978; MOLNÁR et al., 1998).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) possui sensibilidade maior que o teste IDGA, já que detecta anticorpos em rebanhos com prevalência da LEB inferior a 1% e o IDGA permite identificar a doença em apenas 50% do rebanho, quando comparado ao ELISA, pode ser utilizado em amostras de soro e leite, em amostras individuais ou inúmeras amostras ao mesmo tempo (EVERMANN, 1992; GONZÁLEZ, et al., 1999; MATOS; BIRGEL JÚNIOR; BIRGEL, 2005).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), meio diagnóstico para detecção do antígeno, é considerada sensível, específica e útil na detecção precoce da doença (CAMARGOS, 2001; CAMARGOS et al., 2005). Como o diagnóstico é baseado na análise do DNA pró-viral do VLB, essa técnica diferencia bezerros não infectados que apresentam anticorpos colostrais dos bezerros realmente infectados pelo VLB (RADOSTITS et al., 2002).

De acordo com Del fava e Pituco (2004) e Camargos et al. (2005), embora a PCR apresente custos mais elevados e não ter sido desenvolvida para substituir os testes sorológicos tradicionais, esta técnica pode ser utilizada de forma complementar à sorologia, por exemplo para detectar animais infectados precocemente e para confirmar a infecção em amostras de sangue.

O diagnóstico por Radioimunoensaio (RIE) é um dos mais sensíveis testes para a detecção de anticorpos para o VLB em amostras de leite e soro de animais expostos até duas semanas, caso contrário, a sensibilidade não é superior a do teste IDGA (EVERMAN, 1992; JOHNSON; KANEENE, 1992).

Outra técnica pela detecção do antígeno é a microscopia eletrônica que pode ser realizada em partículas do vírus obtida por cultivos celulares, entretanto, não é considerado

um método de rotina em rebanhos (WERLING; MULLER-DOBLIES; LANGHANS apud BOABAID, 2011).

A imunistoquímica também tem sido utilizada (SHINAGAWA et al., 1994; CHIBA et al., 1995; SIMÕES, 2007). A imunofenotipagem pode ser realizada para avaliar que tipo de linfócito predomina nos tecidos tumorais de animais com leucose (AQUINO et al., 2000; SIMÕES, 2007). Segundo Dequiedt et al. (1995) e Tajima et al. (1998), células infectadas possuem mutações do p53 e alterações de bcl2, e como esses gens participam do mecanismo de apoptose, a imunomarcagem dessas proteínas também podem ser realizadas para avaliação da doença.

3.2 DIARREIA VIRAL BOVINA

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence a família Flaviviridae, gênero *Pestivirus*, é considerado um vírus pequeno (40-60nm de diâmetro) com formato esférico a pleomórfico, possui um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope lipoproteico contendo três glicoproteínas virais: gp48/E0, gp25/E1 e gp53/E2 (HORZINEK, 1991; GOENS, 2002; RADOSTITS et al., 2002).

O genoma do BVDV é composto por uma molécula de RNA linear fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 12,5kb, além de ser formado por proteínas não-estruturais (Npro, P7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) que estão envolvidas no processo de replicação viral e as estruturais (C, Erns, E1 e E2) que exercem funções relacionadas ao revestimento do RNA viral, além de permitirem a entrada e saída das partículas virais das células infectadas (DONIS, 1995).

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

O BVDV é classificado em dois genótipos de acordo com a análise filogenética do genoma viral, ou seja, a partir de variações na sequência de nucleotídeos na região 5' não traduzida (5'UTR): BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH, 2003).

Os vírus do genótipo BVDV-1 são responsáveis por infecção de caráter brando a moderado além de abrangerem a maioria das cepas usadas na produção da vacina e das estirpes de referência. Em contrapartida, os do genótipo BVDV-2 foram identificados em surtos da doença aguda, porém incluem também isolados de virulência baixa ou moderada, de

soro fetal bovino e de animais permanentemente infectados nascidos de mães vacinadas contra o BVDV (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994; RADOSTITS et al., 2002).

Além disso, tem sido proposta uma subclassificação do BVDV-1 em 11 subgenótipos (VILCEK et al., 2001) e do BVDV-2 em pelo menos dois subgrupos (FLORES et al., 2002).

O BVDV-1.a foi isolado em quadros de infecção respiratória, enquanto o BVDV-1.b é mais frequente em infecções fetais em estágios gestacionais tardios (FLORES et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007).

Uma característica dos Pestivirus é a existência dos biótipos, que são grupos de vírus com a mesma constituição genética, porém possuem diferenças na indução de alterações microscópicas visíveis (vacuolização e lise) em cultivos celulares epiteliais *in vitro* (DEREGT; LOEWEN, 1995).

Deste modo, são classificados em citopático (CP) e não citopático (NCP), de acordo com o efeito da replicação do vírus em cultivo celular. As cepas NCP representam a maioria dos isolados de campo, e estão associadas às diversas manifestações clínicas da infecção. No entanto, amostras CP são isoladas de animais que desenvolvem a Doença das Mucosas (LINDENBACH; RICE, 2001; RADOSTITS et al., 2002).

Um estudo de análise de polipeptídeos virais revelou a produção da proteína não-estrutural NS3/p80 em células infectadas com as amostras CP. Em contraste, não se evidenciou a geração desta proteína em células infectadas com as amostras NCP que produziram apenas o polipeptídeo precursor NS23/p125 (BOTTON, 1998). Portanto, a proteína designada NS/p80 passou a ser considerada como um marcador de citopatogenicidade (BAKER, 1995; DONIS, 1995; RADOSTITS et al. 2007).

A transmissão horizontal da Diarreia viral bovina (BVD) pode ser direta ou indireta. Na forma direta o BVDV pode ser transmitido pela saliva, secreções nasais, oculares, urina, fezes, sêmen, embrião, placenta, sangue e fômites (HOUE, 1995; VOGEL et al., 2001; POTGIETER, 2004).

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

De acordo com Lindberg e Houe (2005), num rebanho infectado pelo BVDV, existem duas potenciais fontes de infecção: o bovino que está na fase aguda da enfermidade denominado transitoriamente infectado (TI) e o bovino persistentemente infectado (PI).

O PI é o animal em que a infecção ocorre pós-natal, em bovinos que não tiveram exposição prévia ao vírus e neste ocorre uma viremia transitória seguida de produção de anticorpos (HOUE, 1995).

Os fetos que se contaminam no início da gestação (infecção transplacentária), ou seja, antes do desenvolvimento da competência imunológica são os considerados persistentemente infectados (PI). Isto ocorre porque nessa fase da gestação, o sistema imunológico do feto é imaturo e as proteínas virais são reconhecidas erroneamente como próprias, deste modo, o animal PI torna-se imunologicamente tolerante ao BVDV (DEREGT; LOEWEN, 1995).

Segundo Brownlie (1990), a infecção de fêmeas prenhes entre os dias 40 e 120 de gestação frequentemente resulta na geração de animais PI. Embora a maioria dos bezerros PI nascerem fracos, debilitados, com problemas respiratórios, crescimento retardado, malformações congênitas ou morrerem no primeiro ano de vida, existem relatos de animais nessa condição que sobreviveram até a idade adulta e foram capazes de se reproduzir, gerando progênes PI (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000; FLORES, 2005).

O animal PI contribui fundamentalmente para a manutenção do BVDV nos rebanhos, já que se tornam uma fonte constante de eliminação do vírus em altos títulos em secreções e excreções (DEREGT; LOEWEN, 1995; RADOSTITS et al., 2002; POTGIETER, 2004). Por outro lado, a eliminação do vírus pelos animais TI geralmente dura poucos dias ou eventualmente semanas (LINDBERG; HOUE, 2005).

O sangue desses animais pode ter alta dose viral, da mesma forma a saliva, secreção nasal, sêmen, leite, urina e fezes (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004).

A viremia é detectada nas primeiras 24 horas da infecção que pode persistir por até 15 dias com um período de incubação prévio de aproximadamente três a sete dias (BAKER, 1995; BROWNLIE, 2002; FLORES, 2005).

A infecção natural da BVD ocorre em bovinos, ovinos, suínos, caprinos (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). São também susceptíveis coelhos, búfalos, lhamas e alpacas (BEER, 1999).

A soropositividade para BVD já foi confirmada em suínos (ROEHE et al., 1998), caprinos (CASTRO et al., 1994), ovinos (BRUM et al., 2002), bubalinos (PITUCO, 2009) e javalis cativos (FLORES et al., 2005). A doença afeta ambos os sexos e todas as classes animais após o fim da imunidade colostrar (BAKER, 1995; RADOSTITS et al., 2007).

Alguns fatores, tais como densidade animal, aptidão do rebanho (leiteiro ou corte), sistema de criação (sistemas intensivo, semi-intensivo ou extensivo), programa de vacinação,

práticas de manejo e medidas de biossegurança adotadas por cada propriedade são considerados de risco para BVD (PACHECO, 2010).

O agente etiológico da BVD apresenta distribuição mundial e já foi identificado na maioria dos países onde há criação de bovinos (FLORES et al., 2005).

No Brasil, Richtzenhain (1997), analisando 2.448 amostras provenientes de 56 propriedades em diversos estados, encontrou pelo menos um animal soropositivo em todas as propriedades, ademais, o referido autor verificou prevalência de 65% em Minas Gerais, 84% no Mato Grosso do Sul, 67% no Paraná, 71% no Rio de Janeiro, 73% no Rio Grande do Sul e 78% em São Paulo.

Um inquérito sorológico foi realizado no qual 4.065 soros bovinos provenientes de rebanhos com problemas reprodutivos de vários estados do Brasil foram avaliados, e 47,7% das amostras foram reagentes pela soroneutralização (PITUCO; DEL FAVA, 1998).

Na região Sul, Scherer et al. (2002) detectaram, por meio da soroneutralização, 74,7% de positividade em amostras de soro e leite provenientes do Rio Grande do Sul. A prevalência do BVDV foi estimada no rebanho bovino da região sul do Estado do Rio Grande do Sul, em que 1.734 amostras de soro foram submetidas à prova de soroneutralização procedentes de 85 propriedades, destas, 1.150 (66,32%) foram positivas, com a detecção de bovinos sorologicamente positivos em 70 (82,35%) propriedades (QUINCOZES et al., 2007).

Ainda no Rio Grande do Sul, a análise de 1.264 amostras de soro bovino procedentes de 100 municípios demonstrou prevalência de 39,33% (FLORES et al., 2005).

Em Santa Catarina, Fino et al. (2013) obtiveram 58,25% (n=309) de positividade em fêmeas da raça Crioula Langeana.

Na região Centro-oeste, foram coletadas 207 amostras de soro bovino em Goiás, verificando que 54,11% dos animais apresentaram anticorpos contra o vírus da BVD (GUIMARÃES et al., 2001). Em estudos posteriores no mesmo estado, resultados semelhantes foram encontrados por Brito et al. (2010) em que 64% de 3.533 fêmeas bovinas com idade acima de 24 meses, foram reagentes para virusneutralização.

Em relação a região Sudeste, uma prevalência de 61,7% foi encontrada por Figueiredo et al. (1997) no Estado de Minas Gerais, valor semelhante ao encontrado por Mineo et al. (2006) de 58,43% em um rebanho bovino de 243 fêmeas procedentes da região do Triângulo Mineiro.

Em uma pesquisa utilizando o teste de ELISA indireto, analisando amostras de soro e de leite de 376 vacas lactantes não vacinadas, provenientes de 10 propriedades localizadas nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo, demonstrou a

ocorrência de anticorpos em 57,56% e 56,49% dos animais de Minas Gerais e São Paulo, respectivamente (DIAS; SAMARA, 2004).

Junqueira et al. (2006) observaram prevalência de 98,0% (204/208) bovinos da raça Nelore proveniente da região do oeste do Estado de São Paulo reagentes para BVD.

No nordeste, 64,7% de animais foram reagentes em um estudo com amostras de bovinos coletadas em matadouros do Estado de Sergipe (MELO et al., 1997). Na Paraíba, Thompson et al. (2006) verificaram 22,2% de soroprevalência entre 2.343 amostras de sangue bovino coletadas em 72 propriedades. Estudo recente realizado no Maranhão apresentou 61,5% de positividade dentre 400 amostras de soro de fêmeas bovinas analisadas pelo método ELISA (CHAVES et al., 2010).

Na região Norte do Brasil, em uma pesquisa de anticorpos para BVD, foram testados 1.920 fêmeas da raça Nelore procedentes da mesorregião Sudoeste do Pará nas cidades de Marabá e Parauapebas, e a prevalência média encontrada foi 40,0% (COSTA et al., 2012). Outro estudo realizado no Estado do Pará, nos municípios de Castanhal, São Francisco do Pará, Garrafão do Norte, Santa Izabel do Pará e Capitão Poço, detectou a presença de 40,21% (152/378) de zebuínos da raça Nelore soropositivos para o BVDV (KZAM, 2013).

Para Hamers et al. (2001), Flores (2005) e Radostits et al. (2007) a patogenia está relacionada com o biótipo do vírus, ou seja, estirpes NCP apresentam tropismo pelo trato respiratório, leucócitos, órgãos linfóides, sendo esse o biótipo que atravessa a placenta, enquanto o alvo das estirpes CP é o trato digestório.

Quando a infecção ocorre pela via oro-nasal, o epitélio do trato respiratório superior, a orofaringe e o tecido linfóide regional são os sítios primários de replicação viral, além de tecidos em constante divisão como as placas de Peyer e o feto (BROWNLIE, 2002; FLORES, 2005).

Após introdução ao hospedeiro, o BVDV se replica na mucosa nasal e posteriormente nas tonsilas, timo e íleo. Em seguida, ele se difunde aos linfonodos regionais e chega a corrente sanguínea em que megacariócitos e linfócitos constituem os principais alvos do vírus que induz necrose dessas células e prejudica a função daquelas que sobrevivem à infecção (POTGIETER, 2004). De acordo com Brownlie (2002) e Flores (2005), a viremia ocorre entre três e 10 dias pós-infecção.

Em vacas imunocompetentes e nas infecções fetais, o BVDV pode causar significativa perda reprodutiva inicial, com falha de fertilização, mortalidade embrionária com reabsorção, abortamento e nascimento de bezerros fracos (RADOSTITS et al., 2002; GROOMS, 2004; PORTGIETER, 2004; FLORES, 2005). Isso se dá pelo fato do vírus possuir tropismo pelas

células das linhagens germinativas, infectando o ovário e permanecendo nele por até 60 dias, ocasionando ovarite e, conseqüentemente, ausência de ovulação. Além de poder promover salpingite e endometrite (GROOMS, 2004).

A infecção transplacentária do feto ocorre através da vasculite no lado materno da placenta causado pelo BVDV, o que permite o acesso à circulação fetal (RADOSTITS et al., 2002; GROOMS, 2004). Somente em animais não imunizados, o BVDV é capaz de invadir os placentomas e se replicar no trofoblasto, atingindo assim, o feto (BROWNLIE, 2002; POTGIETER, 2004).

A ação teratogênica do BVDV é considerada maior entre os dias 100 e 150 de gestação (SPRECHER et al., 1991; HOUE, 1995; MOENNIG; BROCK, 2004).

Nos machos, segundo Voges et al. (1998), o BVDV pode estabelecer a infecção persistente nos túbulos seminíferos após a infecção aguda durante a puberdade e o vírus passa a ser liberado constantemente no sêmen. Os efeitos reprodutivos da infecção estão relacionados à baixa qualidade do sêmen por defeitos morfológicos dos espermatozoides, diminuição da mobilidade e da concentração espermática (GROOMS, 2004).

Além dos danos reprodutivos, o BVDV tem a capacidade de causar depressão do sistema imune de bovinos provocando a diminuição na população das células de defesa (linfócitos T e B), afeta a função macrofágica e, desta forma, predispõe o organismo do hospedeiro às infecções secundárias (RADOSTITS et al., 2007). Agentes como hespervírus bovino tipo 1, rotavírus, coronavírus, *Pasteurella haemolytica*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* e *Salmonella* spp. são frequentemente associados a quadros clínicos de BVD (BROWNLIE, 2002).

As manifestações clínicas após a infecção pelo BVDV dependem de muitos fatores relacionados ao hospedeiro e ao ambiente. Entre os fatores do hospedeiro estão a imunocompetência e a imunotolerância ao BVDV, estado imune (passivo pelos anticorpos colostrais ou ativo pela exposição ao BVDV ou vacinação), status gestacional, idade gestacional do feto no momento da infecção, nível de estresse ambiental no momento da infecção e concorrência com outros patógenos (RADOSTITS et al., 2002).

A infecção pelo BVDV tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações clínicas, desde infecções inaparentes ou com sinais leves até uma doença aguda e, por vezes, fatal (BROWNLIE, 1990). Entretanto, de acordo com Baker (1995), na maioria das vezes (70% a 90%) as infecções por BVDV nos bovinos ocorrem sem sinais clínicos ou de forma inaparente, podendo ser observado apenas sinais de hipertermia transitória e leucopenia.

Para Brock (2004), a infecção pelo BVDV está relacionada a um complexo de síndromes envolvendo os sistemas reprodutivo, respiratório, digestório, circulatório, imunológico, linfático, musculoesquelético e o sistema nervoso central.

Enfermidade gastroentérica aguda ou crônica, doença respiratória em bezerros, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, patologias cutâneas e imunossupressão estão entre as consequências mais frequentes da infecção pelo vírus (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995).

Na forma da doença aguda, febre transitória, depressão, anorexia, descargas óculo-nasais, salivação, fezes aquosa, ocasionalmente, pododermatite e lesões crostosas no plano nasal e na região periocular, erosões e ulcerações orais são observadas em animais infectados (POTGIETER, 2004; SANTOS et al., 2011).

É importante destacar as alterações clínico-patológicas relacionadas ao sistema reprodutivo como infertilidade temporária, queda nas taxas de concepção, retorno ao cio, morte embrionária ou fetal, abortos ou mumificação, natimortalidade, teratogênese ou o nascimento de bezerros fracos e inviáveis (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995; PASSLER et al., 2007).

O BVDV foi também associado a alterações neurológicas em um bovino com 15 meses de idade, do sexo feminino, raça Angus, em que se observou meningoencefalite multifocal aguda, degeneração neuronal, necrose e gliose no histopatológico. O isolamento viral e a genotipagem classificou o vírus como BVDV tipo 2 (BLAS-MACHADO et al., 2004).

Os achados patológicos variam de acordo com o curso e evolução da doença (RADOSTITS et al., 2002) e a taxa de mortalidade fica em torno de 8%, superada pela taxa de morbidade que pode chegar a 90% em alguns casos (POTGIETER, 2004).

À necropsia podem ser encontradas alterações no trato gastrointestinal, especialmente nas placas de Peyer que consistem em lesões necróticas e hemorrágicas e aumento dos linfonodos mesentéricos. Adicionalmente, pode ser observada enterite catarral ou hemorrágica com conteúdo intestinal de cor escura e consistência aquosa (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; SCHMITZ, 2007; SANTOS et al., 2011). Ainda pode ser observada esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia (POTGIETER, 2004).

Histologicamente, observa-se infiltrado mononuclear na lâmina do intestino delgado e rarefação linfóide com infiltrado histiocitário nas regiões centro-foliculares de linfonodos e nas placas de Peyer, além de necrose das placas de Peyer, no miocárdio, nos pulmões, gliose e neuronofagia no cérebro, além de nefrite e degeneração tubular renal (BIELEFELDT-

OHMANN, 1995; SCHMITZ, 2007; SANTOS et al., 2011). Potgieter (2004) ainda reporta infiltrado mononuclear no miocárdio, baço, linfonodos e na região periportal do fígado.

Devido à diversidade de manifestações sintomatológicas, o diagnóstico definitivo só pode ser realizado com o auxílio de testes laboratoriais (FINO et al., 2012). Várias são as técnicas disponíveis para a detecção do BVDV ou de animais expostos ou vacinados ao vírus, cada método possui suas vantagens, desvantagens e aplicabilidade específicas a cada necessidade (GOYAL apud BAUERMANN, 2013).

A maioria dos testes não possui a capacidade de diferenciação entre BVDV-1 e BVDV-2. O isolamento viral em monocamadas de culturas celulares de bovinos é o teste referenciado como padrão para o diagnóstico da BVD, além de ser o método recomendado pela OIE em casos de comércio internacional. Entretanto, por ser uma prova laboriosa, mais demorada, com custos elevados, não é indicada para o processamento de um grande número de amostras (RADOSTITS et al., 2007; DUBOVI et al., 2013).

Para isolamento viral, o material de escolha deve ser fragmentos do fígado ou baço, mucosa do intestino delgado, linfonodos, sangue total, soro e sêmen (OIE, 2008).

Por outro lado, por serem mais baratos, rápidos e apresentarem boa sensibilidade, métodos diagnósticos como a imunohistoquímica e ELISA estão adquirindo importância (SALIKI; DUBOVI, 2004; FLORES, 2005; RADOSTITS et al., 2007).

O teste ELISA é vantajoso, por permitir uma rápida e precisa identificação de anticorpos específicos anti-BVDV em amostras de sangue total, plasma, soro e leite de animais infectados ou PI, além disso, permite a avaliação de uma grande quantidade de amostras, não requer um preparo prévio das mesmas e os resultados são obtidos em poucas horas (RADOSTITS et al., 2007). De acordo com Niskanen et al. (1989) a determinação da presença de anticorpos contra o vírus da BVD no soro a partir do ELISA é considerada mais sensível e específica do que no leite.

Por sua vez, a imunohistoquímica (IHQ) possui algumas vantagens frente às demais técnicas, como a estabilidade das amostras fixadas em formalina em comparação ao sangue, deste modo, evitando falsos negativos por autólise. Ainda, permite diferenciar bovinos PI de bovinos com infecção aguda com uma só amostra e analisar bezerros neonatos já que os anticorpos colostrais não interferem na técnica. A biópsia de tecido cutâneo da orelha fixada em formol é considerada de escolha para diagnóstico do BVDV pela IHQ (NJAA et al., 2000; BRODERSEN, 2004).

Antígenos virais já foram detectados por IHQ, principalmente em queratinócitos da epiderme, no epitélio de folículos pilosos e células mononucleares da derme de orelhas e pele,

também em histiócitos e linfócitos dos linfonodos, células foliculares da tireoide, no citoplasma de neurônios e, em menor escala, em células da microglia no córtex cerebral e no hipocampo (SANTOS et al., 2011).

O princípio de todos esses testes imunoenzimáticos é similar, em que são utilizados anticorpos específicos para a detecção do antígeno viral, e a revelação do resultado ocorre por meio de uma reação enzimática, sobre substratos específicos ou ainda por meio de anticorpos marcados com fluorocromos (GOYAL apud BAUERMANN, 2013).

Outro teste utilizado rotineiramente para o diagnóstico de BVD é a soroneutralização viral (SN), sendo considerado como teste padrão para a titulação de anticorpos (OIE, 2008).

Também chamada de virusneutralização (VN), 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, resultando na inibição de efeito citopático padrão (ECP). Desta forma, 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., 2006).

Métodos moleculares como RT-PCR são extremamente utilizados para detecção de RNA viral para fins de diagnóstico (GILBERT et al., 1999; KIM; DOBOVI, 2003). Uma das vantagens desses métodos é que são capazes de detectar ínfimas quantidades de ácidos nucleicos virais em amostras de sangue e tecidos. A alta sensibilidade do teste permite detectar RNA viral em células somáticas presentes em amostras de leite e deste modo, identificar rebanhos leiteiros positivos através da análise de amostras coletadas em tanques de leite (OIE, 2008).

Baron et al. (1994) referem-se ainda a outras provas sorológicas, como fixação de complemento, imunofluorescência indireta e imunofluorescência anticomplemento.

3.3 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) é causada pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pertencente a família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae e gênero *Varicellorirus*, podendo ser classificado ainda em subtipos BoHV-1.1 e BoHV-1.2 (ROIZMANN et al., 1992; PELLETT apud THIRY et al., 2006).

A partícula viral tem entre 70 e 110 nm de diâmetro, é constituído por uma molécula de DNA fita dupla com cerca de 140 Kb que codifica aproximadamente 75 proteínas, (destas 33 estruturais e mais de 15 não estruturais). O nucleocapsídeo icosaédrico é envolto por camada

protéica e pelo envelope lipoproteico composto por dez glicoproteínas, denominadas gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM (ROIZMAN et al., 1992; SCHWYZER; ACKERMANN, 1996; D'ARCE, 2002; FENNER; GIBBS; MURPHY, 2010).

As proteínas gB, gC e gD são as mais abundantes e consideradas essenciais para a replicação viral, já que suas quantidades interferem na penetração, reconhecimento do hospedeiro, adsorção, fusão celular do vírus, além de indução de anticorpos neutralizantes (BABIUK; DRUNEN; TIKOO, 1996; SCHWYZER.; ACKERMANN, 1996).

Para Engels e Ackermann (1996), os herpesvírus contêm, pelo menos, dois conjuntos de genes: um envolvido na expressão dos genes e replicação viral e um segundo responsável por funções relacionadas a patogênese, a latência e interação vírus / hospedeiro.

O BoHV-1 apresenta os subtipos 1.1, 1.2a e 1.2b. Este último tem sido indicado como subtipo com menor ocorrência, não sendo associado ao aborto, enquanto os subtipos BoHV-1.1 e BoHV-1.2a têm sido isolados em fetos bovinos abortados (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999).

A transmissão de BoHV-1 pode ocorrer por meio do contato direto entre secreções nasais, oculares e genitais, anexos fetais de animais infectados, ou ainda através da inalação de aerossóis contaminados. A transmissão vertical já foi relatada, sendo condicionada ao estado imunológico da fêmea no momento da infecção (RADOSTITS et al., 2007).

Os bovinos são os principais reservatórios do BoHV-1 (KAHRS, 2001), entretanto a doença já foi diagnosticada em ovinos (TRUEBLOOD; SWIFT; MCHOLLAND-RAYMOND, 1978), caprinos (CHÉNIER; MONTPETIT; HÉLIE, 2004), bubalinos (SCICLUNA et al., 2010), suínos (SAXEGAARD; ONSTAD apud VARADY; TUBOLY; DERBYSHIRE, 1994).

Por terem maior tempo de contato com o vírus, animais mais velhos têm maior probabilidade de ser infectados; machos são frequentemente mais acometidos que as fêmeas (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005; BOALAERT et al., 2005).

De acordo com estudos realizados por Boelaert et al. (2005), Dias et al. (2008), Woodbine et al. (2009), Bezerra et al. (2012) e Souza et al. (2013), os fatores de risco para a ocorrência da enfermidade são: a constante aquisição de animais de diferentes origens, a presença de bovinos mais velhos, a aptidão leiteira e o maior número de cabeças por rebanho. Embora para Van Schaik et al. (2002), Barbosa, Brito e Alfaia (2005) e Solis-Calderon et al. (2005), o mais importante é a introdução no rebanho de animais em período de incubação, em fase aguda ou latentemente infectados pelo vírus.

Podem ainda ser citadas como criações mais predispostas, as que estão sempre em contato com outros rebanhos, inclusive outras espécies, que recebem visitas técnicas sem roupas de proteção para manusear o gado, e as que possuem alta densidade animal (VAN SCHAIK et al., 2001, VAN SCHAIK et al., 2002).

O BHV-1 tem distribuição mundial e sua prevalência em rebanhos bovinos atinge coeficientes variados em diferentes regiões (STRAUB, 2001). A doença foi erradicada da Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Itália (Província de Bolzano), Suíça, Noruega e partes da Alemanha (OIE, 2010).

No Brasil, inquéritos sorológicos, revelam a expressiva disseminação do vírus em rebanhos de corte e leite. Estima-se que 40% a 60% dos bovinos entraram em contato com o vírus e possuem anticorpos para o BoHV-1, embora a maioria não tenha apresentado sinal clínico evidente (PITUCO, 2009). Corroborando com essa informação, anticorpos anti-BoHV-1 foram pesquisados em 21.062 amostras de soros de fêmeas bovinas de 1.992 rebanhos não vacinados contra IBR e com histórico de problemas reprodutivos, procedentes de 21 estados brasileiros. Destas, 13.541 (64,3%) amostras foram reagentes no ELISA (RICHTZENHAIN et al., 1999).

Na região Nordeste foram relatadas prevalências de anticorpos que variam entre 56% e 96%, dependendo do tipo de criação analisada e do método diagnóstico utilizado (FINO et al., 2012). No Estado de Pernambuco, 282 amostras de 18 rebanhos foram testadas pelo teste de soroneutralização e 69,5% dos animais foram positivos (SILVA et al., 1995). Cerqueira et al. (2000) submeteram 558 amostras de soro referentes a propriedades da Bahia, demonstrando que 56% (314/558) foram positivas para ELISA e 52% (289/558) para soroneutralização.

Foram analisados 160 soros para o BoHV-1 oriundos de fêmeas bovinas do Estado do Maranhão, pelo teste de Elisa indireto e destes, 67,50% (108/160) foram positivos (SOUSA et al., 2013).

Na região Centro-oeste, Vieira et al. (2003) encontraram uma soropositividade de 83% nos rebanhos de Goiás, em que foram pesquisados 790 soros de bovinos, através do ensaio imunoenzimático. As amostras eram, em sua maioria (75,3%), provenientes de propriedades (n=90) com problemas reprodutivos, incluindo rebanhos de leite, corte e misto, distribuídas em 40 municípios do estado.

Amostras sorológicas de 6.932 animais procedentes de 892 propriedades localizadas no mesmo estado foram testadas para BHV-1 pelo teste de soroneutralização. A soroprevalência encontrada foi de 51,9% (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005).

No sudeste do país, a ocorrência de anticorpos contra BoHV-1 variou de 14,2 a 87,3% em rebanhos de Minas Gerais (MELO et al., 2002). A detecção de anticorpos foi feita utilizando o teste ELISA. Alexadrino et al. (2011) encontraram, no mesmo estado, a prevalência de 66,1% (68/118) e 52,5% (84/160) de prevalência no Estado de São Paulo, utilizando a vírusneutralização, em fazendas leiteiras e mistas.

Na região Sul, foram encontradas variações entre 18,8 e 64,41% de animais reagentes para BoHV-1 (MÉDICI et al., 2000). Lovato et al. (1995) analisaram pela técnica de soro-neutralização, 7956 soros bovinos leiteiros no Rio Grande do sul e encontraram 18,8% de soropositividade para o BoHV-1.

No Paraná, Dias et al. (2008) avaliaram 1930 soros de bovinos fêmeas por ELISA e registraram prevalência de 64,41%.

Por último, na região Norte, Cavalcante (1997) verificou pela vírusneutralização uma prevalência de 44,73% no Estado do Acre e 86,2% (1715/1988) em Rondônia (OKUDA et al., 2006). No Pará, Costa et al. (2012) obtiveram 33,5% de prevalência a partir da análise de 1920 soros de fêmeas da raça Nelore procedentes dos municípios de Marabá e Parauapebas, localizados na mesorregião Sudoeste do estado.

Dois mecanismos pelos quais o BoHV-1 infecta a célula são conhecidos: a penetração do vírus na célula, através da ligação aos receptores celulares por meio de glicoproteínas específicas do envelope, ou ainda a transferência de partículas virais para uma célula vizinha, evitando a ação dos anticorpos neutralizantes (MUYLKENS et al., 2007).

A replicação do BoHV-1 *in vivo* ocorre na mucosa do trato respiratório ou na mucosa genital, de acordo com a via de infecção, causando necrose e apoptose (MUYLKENS et al., 2007).

O vírus pode penetrar nas terminações nervosas periféricas e migrar, via axônio, para os neurônios dos gânglios nervosos regionais, onde estabelece infecções latentes, ou seja, forma-se genoma viral no interior dos neurônios ganglionares, sem produção de progênie viral e, somente são reativados, quando os animais são expostos a fatores estressantes, que diminuem a resistência imunológica como parto, tratamento por corticóide, transporte, mudanças na dieta, desnutrição, desmame, superlotação (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982; ENGELS; ACKERMANN, 1996; WINKLER; DOSTER; JONES, 2000).

De acordo com Schwyzer e Ackermann (1996), a timidina kinase é uma proteína constituinte do vírus responsável pelo processo de reativação do BoHV-1 em estado de latência.

O BoHV -1 induz resposta humoral e imunitária celular dentro de 7-14 dias, que persiste ao longo da vida, embora possa diminuir a ponto de não ser detectado por alguns testes. Adicionalmente, os anticorpos maternos são transferidos via colostro, tendo semi-vida biológica de cerca de 3 semanas, entretanto pode ser detectado, ocasionalmente, em animais com até nove meses de idade, e raramente em animais a partir dessa idade (OIE, 2010).

A gravidade da doença pode ser determinada por vários fatores como a virulência da estirpe BoHV-1, fatores de resistência do hospedeiro, especialmente a idade, e o potencial de infecção bacteriana secundária (KAASHOEK et al. apud MUYLKENS et al., 2006).

De acordo com Fenner, Gibbs e Murphy (2010), a maioria das infecções apresentam um curso leve ou subclínico. Quadros clínicos discretos em países onde o BoHV- 1 é endêmico, podem ser explicado pela infecção primária de bezerros passivamente imunes (MECHOR et al., 1987; LEMAIRE et al., 2000).

Após um período de incubação de dois a quatro dias, a manifestação clínica da doença caracteriza-se pela ocorrência de febre, anorexia, apatia, descargas mucopurulentas nasais e oculares, conjuntivite unilateral ou bilateral, erosões, hiperemia na mucosa nasal com áreas de necrose focal que pode transformar-se em pústulas e úlceras, dispnéia, tosse, estridor traqueal e aumentos dos linfonodos locais. O curso da doença em casos não graves pode durar de cinco a dez dias (SPILKI et al., 2004; PITUCO, 2009).

Caso o sistema respiratório seja o sítio de infecção, geralmente ocorre uma infecção respiratória subclínica, podendo ser observado uma doença grave com bronquite, entretanto, na maioria dos casos patologia pulmonar não tem sido observada, embora broncopneumonia bacteriana secundária possa ocorrer (RADOSTITS et al., 2000; RIET CORREA, 2007).

Órgãos digestivos não são alvos comuns para BoHV-1, todavia muitas lesões podem ser observadas como glossite, esofagite e rumenites necrosante aguda, enterites de aspecto necrosante e ulcerativo, sendo o desfecho fatal dentro de quatro a cinco dias (METLER et al. apud MUYLKENS et al., 2007). Segundo Pituco (2009), esporadicamente, o BoHV-1 pode comprometer o sistema nervoso central, causando quadro grave de meningoencefalite.

Na infecção pelo BoHV-1, enquanto a taxa de mortalidade é considerada baixa (10%), a morbidade pode alcançar 100%, complicações por infecções bacterianas secundárias ou por outras infecções virais superpostas podem ocorrer (RADOSTITS et al., 2000; KAHRS, 2001).

A queda na produção de leite pode ser observada (HAGE et al., 1998; VAN SCHAİK, 1999). Animais reagentes para BHV- 1 apresentam histórico de aborto, retenção de placenta, metrite, anestro e repetição de cio (RAJESH et al., 2003; ROLA, 2003).

Infertilidade ou nascimento de bezerros débeis ou natimortos são frequentes na infecção. Além disso, em vacas prenhes, a viremia pode causar abortos, geralmente observados entre quatro e oito meses de gestação embora, experimentalmente, a inoculação parenteral do vírus em novilhas induziram a morte embrionária antes dos três meses de gestação (CHOW; MOLELLO; OWEN, 1964; DEL FAVA, 1996).

O diagnóstico da infecção pelo BHV-1 pode ser através do diagnóstico etiológico ou sorológico. As técnicas sorológicas mais utilizadas são a soroneutralização e o ELISA, e estes testes têm sido utilizados em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos e triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

A técnica de SN é fundamental na realização de testes pareados, para a identificação das diferentes fases da infecção e a circulação viral no rebanho (BASHIR et al., 2011). A SN possui menor sensibilidade que o ELISA (KRAMPS et al., 1994).

O ELISA para o diagnóstico do BHV-1 apresenta alta especificidade, entretanto baixa sensibilidade, e os anticorpos podem ser detectados no soro ou plasma, e com uma sensibilidade mais baixa no leite (OIE, 2010).

A detecção de animais portadores do vírus em latência também é de extrema importância nos programas de controle e erradicação da doença e, como os animais podem apresentar baixo título de anticorpos para o BHV-1, pode não ser possível realizar testes sorológicos, bem como, diferenciar animais com anticorpos induzidos por vírus vacinal daqueles oriundos da exposição natural ao vírus (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; OIE, 2010).

O diagnóstico por isolamento pode ser realizado a partir de *swabs* de secreções nasais, oculares e genitais, além de sêmen, tecidos de fetos abortados e anexos fetais. Apesar de ser considerado o teste padrão para a identificação do BoHV-1, é uma técnica laboriosa, de custo elevado e o tempo exigido para a obtenção de resultados é elevada (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

As técnicas de imunoperoxidase e imunofluorescência são alternativas mais rápidas para o diagnóstico virológico. O material para análise inclui cortes ou impressões de tecido, esfregaço de secreções e de sêmen. Em tecidos autolisados ou com contaminação bacteriana, podem ocorrer reações inespecíficas que interferem na leitura final dos testes (OIE, 2010).

A PCR pode ser utilizada na identificação de animais positivos durante a forma latente da infecção (DEKA et al., 2005; SCHMITT; HENDERSON, 2005). Masri et al. (1996) detectaram o BHV-1 precocemente, a partir do quarto dia pós-infecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram avaliados 350 bubalinos (*Bubalus bubalis*) procedentes de 12 propriedades agropecuárias localizadas nas Mesorregiões: metropolitana de Belém, do Marajó e do Nordeste Paraense.

Amostras de 126 animais procedentes de cinco propriedades localizadas na Microrregião do Arari no Marajó (Soure, Cachoeira do Arari, Chaves, Santa Cruz do Arari e Ponta de Pedras) foram obtidas em matadouro oficial localizado em Belém, sob inspeção estadual. As outras 224 amostras foram provenientes de sete propriedades localizadas nos Municípios de Belém, Santa Bárbara, Castanhal, Santo Antônio do Tauá, Marapanim, Abaetetuba e Nova Timboteua (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de amostras de bubalinos de acordo com a procedência.

Mesorregião	Município	Nº de amostras
Nordeste Paraense	Belém	32
	Santa Bárbara	32
	Castanhal	25
	Santo Antônio do Tauá	25
	Marapanim	30
	Abaetetuba	36
	Nova Timboteua	44
	Soure	25
Marajó	Cachoeira do Arari	48
	Chaves	30
	Santa Cruz do Arari	13
	Ponta de Pedras	10
Total		350

4.1 COLHEITA DE AMOSTRAS

Amostras de sangue de cada animal, sem predileção por raça ou sexo, foram colhidas no Matadouro de Inspeção estadual no momento da sangria na região dos grandes vasos do pescoço utilizando tubos de 10 mL esterilizados e sem anticoagulante.

Nas propriedades, o sangue foi coletado dos bubalinos através da venopunção da jugular utilizando tubos a vácuo de 10 mL sem anticoagulante. Animais com menos de sete meses e no periparto foram excluídos da coleta, a fim de evitar falsos resultados.

É importante ressaltar que as propriedades escolhidas para o estudo não adotam vacinação contra BVD e IBR.

As amostras de sangue coletadas foram transportadas resfriadas em caixas de polímero expandido até o laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (LABOPAT).

Os procedimentos de colheita foram auxiliados por fichas (apêndice 1) contendo: identificação, procedência e idade dos animais. Além disso, foi aplicado a proprietários e/ou tratadores, questionário contendo variáveis que pudessem ser fatores de risco para BVD e IBR.

4.2 PROCESSAMENTO

As amostras de sangue sem anticoagulante coletadas (matadouro e propriedades) foram centrifugadas para obtenção dos soros, transferidos para microtúbulos devidamente identificados e congelados à temperatura de -20°C até a realização das provas sorológicas.

Os soros de cada animal foram submetidos às técnicas de sorologia (imunodifusão para leucose e soroneutralização para rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina) no Laboratório de viroses de bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo.

4.2.1 Imunodifusão em gel de Agar

A detecção de anticorpos séricos anti-vírus da leucose foi realizada através da prova de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony em gel de Ágar, utilizando o conjunto de reativos elaborado pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR): substrato gelatinoso, o antígeno glicoproteico (gp51) da cápsula viral, segundo metodologia padronizada por Birgel (1982) e modificada por D'Angelino (1991).

Preparou-se o gel de Ágar diluindo 0,9 g de Ágar Noble em 100 mL de solução tampão feita a partir da mistura de NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, EDTA dissódico, NaN₃ e NaOH. Posteriormente, a solução foi fervida em banho-maria até que o Ágar se dissolvesse por completo.

Foi adicionado 5 mL de Ágar a 0,9% em placas de Petri armazenadas em câmara úmida a 4°C. Após 24 horas foi realizada a perfuração dos poços com um cortador padrão com 7 furadores (sendo um central e seis periféricos) de aço inoxidável do tipo “roseta”. Em seguida, os cilindros de Ágar foram removidos por sucção com auxílio de uma ponteira conectada a uma bomba a vácuo.

25 µL dos soros de referência e das amostras-teste foram dispostos em poços periféricos de forma alternada, bem como o antígeno no central (Figura 1a). As placas foram incubadas dentro de uma câmara úmida, em temperatura ambiente (20°C a 25°C) durante 3 dias (Figura 1b) e, posteriormente, a leitura foi realizada em ambiente escuro, com o auxílio de um foco de luz forte em feixe estreito, a fim de se verificar a presença de linhas de precipitação entre os poços periféricos e o poço central (Figura 1c).

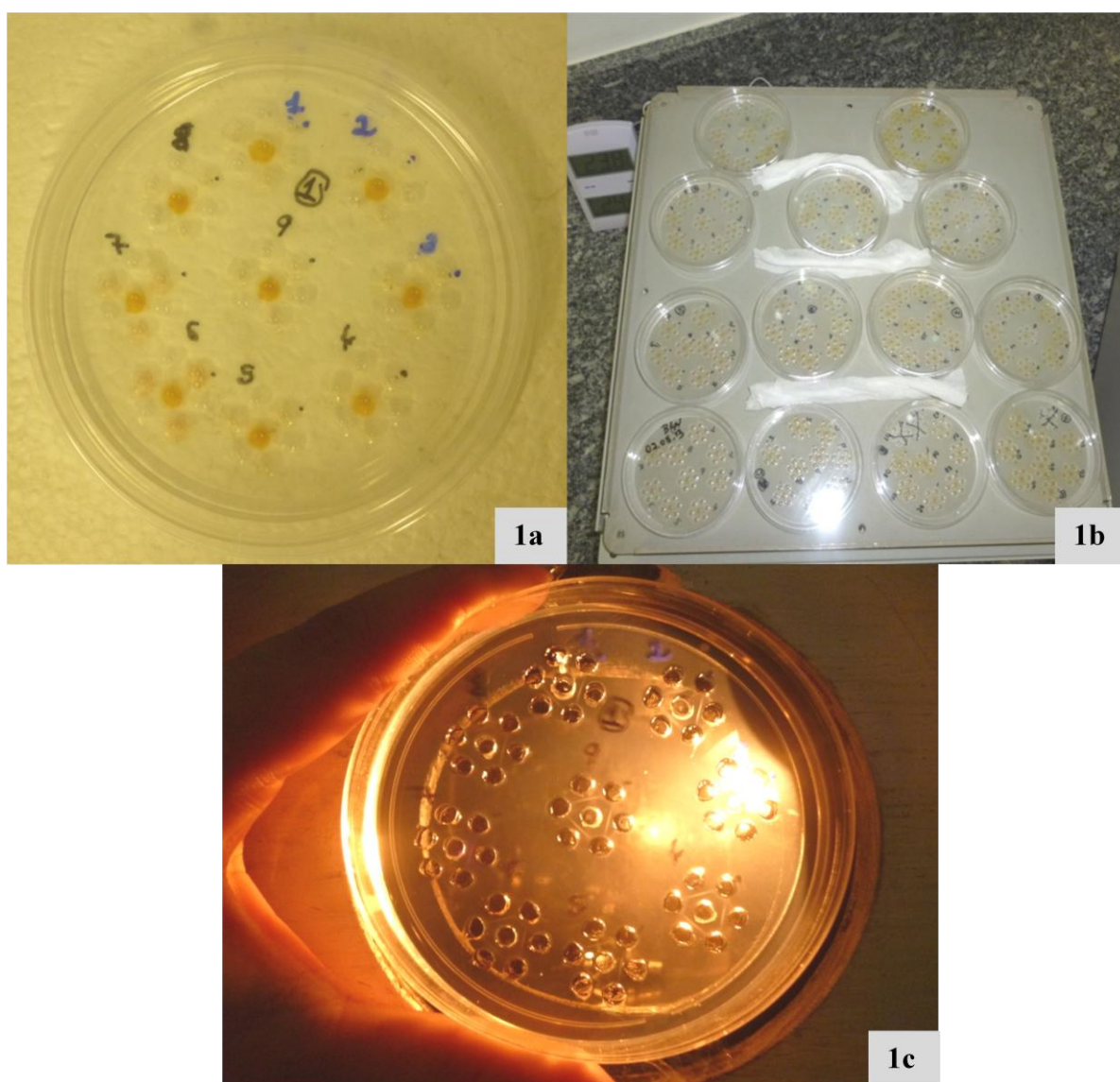


Figura 1-Imunodifusão em gel de Ágar. **a:**Placa com soros de referência, soros testes e antígeno dispostas em poços. **b:** Placas incubadas dentro de câmara úmida, em temperatura ambiente (20°C a 25°C). **c:** Leitura. A precipitação foi classificada em negativa, iracamente positiva ou positiva.

4.2.2 Soroneutralização

As amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao teste de soroneutralização para IBR e BVD utilizando-se a técnica descrita pelo Manual for Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (OIE, 2008; OIE, 2010).

A amplificação viral foi realizada em células de linhagem de rim bovino (MDBK - Madin Darby Bovine Kidney) livres de contaminações. As células utilizadas 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.

Primordialmente, as alíquotas de soro (controle e teste) foram inativadas em banho-maria à 56 °C durante 30 minutos. Após serem identificadas, placas de poliestireno para microneutralização de 96 cavidades de fundo plano (Figura 2a) foram utilizadas.

Os soros foram testados em triplicata na diluição final de 1:2 (após adição do vírus) em que se adicionou, com auxílio de pipetas e ponteiros estéreis, meio Eagle MEM (controle de células) na coluna 1 das placas, soros teste na linha A das cavidades 2 a 12 (total de 11 amostras) e na linha E das cavidades 2 a 12 (total de 11 amostras).

Objetivando o controle de toxicidade do soro, adicionou-se 50 µL meio Eagle MEM nas linhas A e E das cavidades 2 a 12.

Em seguida, a solução de trabalho dos vírus foram preparadas da seguinte forma: Em 10 tubos, realizou-se diluições seriadas em base 2, a partir da solução de trabalho do vírus até 1,95 TCID₅₀/mL.

Posteriormente, nas placas para sorologia de IBR, adicionou-se solução de trabalho do vírus BoHV-1 (200 DICT₅₀/cavidade) nos poços, exceto no controle de toxicidade de soros (linha A, linha E) e controle de células (coluna 1). Do mesmo modo, nas placas de soroneutralização para BVD, adicionou-se a solução de trabalho da cepa do BVDV (100 DICT₅₀/cavidade).

As placas de retitulação dos vírus foram preparadas da seguinte forma: retitulou-se os vírus em duplicata em diluições seriadas na base 10, separando 14 tubos de 10 mL, com diluições em dois grupos com oito tubos cada.

Nas placas para IBR, foi adicionado 100 µL da suspensão de células MDBK na concentração de 300.000 células/mL em todas as placas que foram incubadas por 96 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Figura 2b).

De modo semelhante, as placas para BVD, foram incubadas por uma hora na mesma estufa, e após esse período, receberam 50µl de suspensão de células MDBK na mesma concentração em cada cavidade.

Adicionalmente, o teste foi validado através do controle de células, do controle de soros, do controle de doses, resultado dos soros controle e da retitulação.

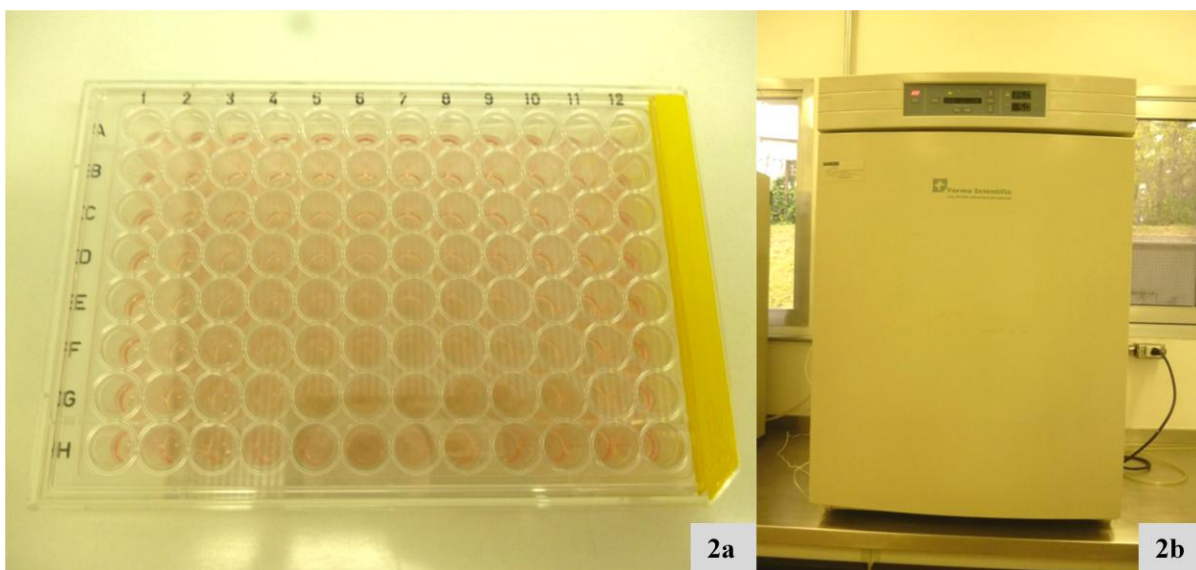


Figura 2 - a: Placas para microneutralização de 96 cavidades. **b:** Estufa à 37°C com 5% de CO₂.

Foi realizada leitura das placas em microscópio invertido após 4 dias de incubação, iniciando pelas placas controles para validação da prova.

Em relação às placas testes, quando ocorreu soroneutralização viral (Efeito Citopático ausente) (Figura 3A) em duas ou mais cavidades, o soro foi considerado reagente; caso contrário (Efeito citopático positivo)(Figura 3B), o soro foi considerado não reagente.

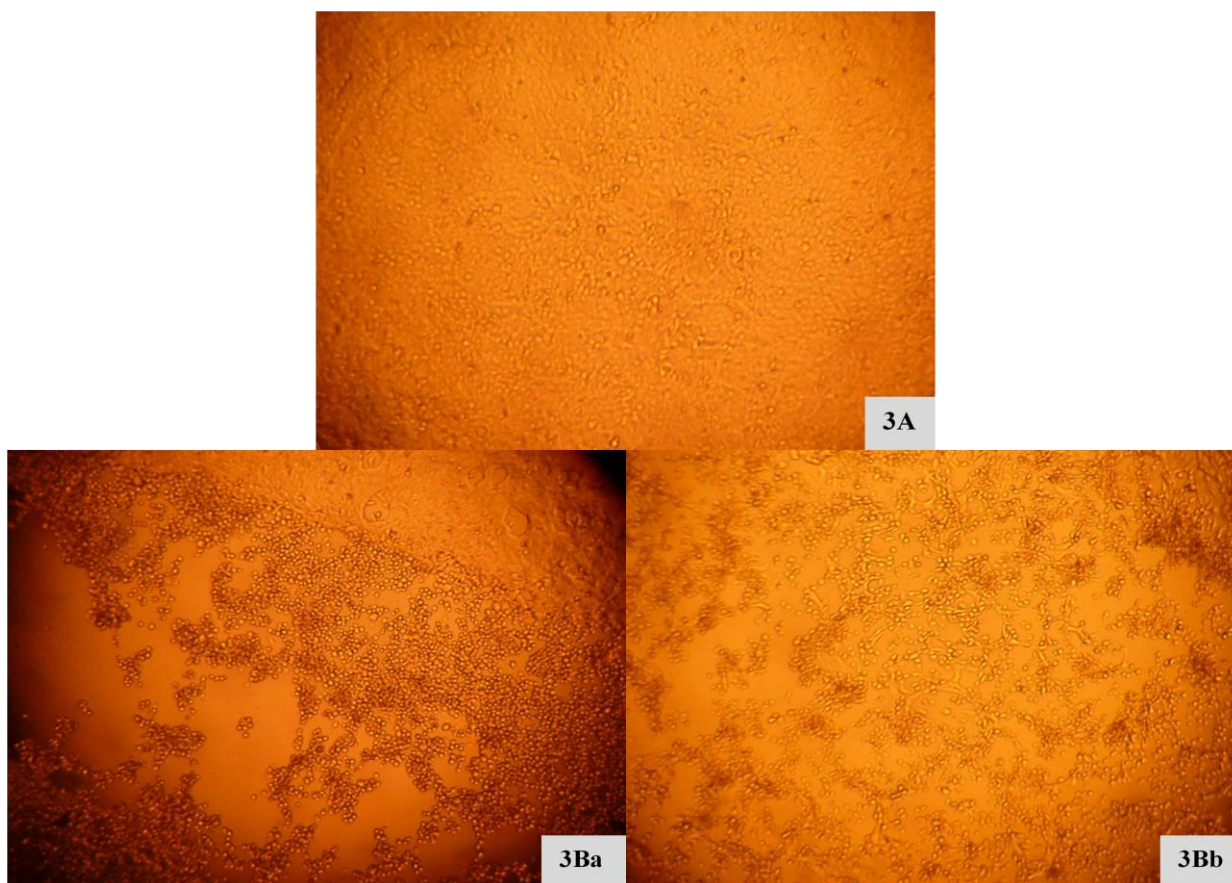


Figura 3- A:Efeito citopático ausente. **Ba:** Efeito citopático pelo BoHV-1 presente. **Bb:** Efeito citopático pelo VBVD presente

4.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram tabulados e avaliados através de software estatístico *Statistical Analysis System* (SAS, 2001), utilizando-se o teste estatístico qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5%. Foram comparadas as frequências das variáveis positivo e negativo para leucose bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina, de acordo com o sexo, idade e procedência.

Para determinar os fatores de risco, os resultados dos questionários epidemiológicos foram tabulados e o teste *odds ratios* utilizado para cada variável investigada, calculadas considerando como variável dependente o status sorológico do animal (positivo ou negativo) para a diarreia viral bovina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de anticorpos contra o vírus da leucose bovina, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina da população estudada foi, respectivamente: 0% (0/350), 53,71% (188/350) e 91,71% (321/350), como verificado na Tabela 2, sendo observada diferença estatística para todas as doenças.

Tabela 2 - Frequência (%) de anticorpos contra vírus da leucose, vírus da diarreia viral e vírus da rinotraqueíte infecciosa em bubalinos criados no Estado do Pará.

Resultado	Doença		
	Leucose	IBR	BVD
Reagente	0% (0/350) ^a	91,71% (321/350) ^b	53,71% (188/350) ^c
Não reagente	100% (350/350)	8,29% (29/350)	46,29% (162/350)

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05)

5.1 LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

No presente estudo, o teste de imunodifusão em gel de ágar não apresentou animais reagentes ao vírus da leucose. Resultado semelhante ao encontrado por Romero et al. (1981) em que 234 amostras de soro bubalino coletadas em propriedades dos Estados do Amapá, Pará e Rio de Janeiro foram negativas para LEB através do mesmo teste; bem como aos estabelecidos por Del Fava et al. (1997), entre 470 búfalas criadas em 15 rebanhos do Vale do Ribeira, em São Paulo que também não verificou positividade. Os últimos autores atribuíram este fato a predominância do manejo extensivo de búfalos e seu pouco ou nenhum contato com os bovinos, a principal fonte de infecção da doença. Contudo, os bubalinos da presente pesquisa mantinham contato com bovinos em 6 propriedades avaliadas.

Rajão et al. (2010) também não registraram bubalinos sororeagentes ao teste IDGA em uma análise de 670 búfalas criadas em sistema semi – intensivo, mantidas em conjunto com bovinos sorologicamente positivos para leucose em propriedades localizadas em Minas Gerais.

Em pesquisas realizadas fora do Brasil, resultados negativos na espécie bubalina também foram referidos na Tanzânia por Hafez et al. (1980), no Egito por Hamblin et al. (1990), em Taiwan por Wang (1991) e na Turquia por Akça et al. (2004).

Os poucos dados relevantes disponíveis na literatura indicam que a espécie bubalina é menos suscetível a leucose enzoótica bovina. Nesse sentido, um estudo de prevalência da leucose em rebanhos bubalinos criados extensivamente na baixada maranhense foi realizado, sendo analisados soros de 232 animais pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose (IDGA) e, destes, somente 4,21% (10/232) dos animais foram reagentes (CHAVES et al., 2012a).

A baixa ocorrência da doença na espécie bubalina também foi demonstrada em estudo no Paquistão com 370 búfalos, em que apenas 0,8% dos animais reagiram ao teste de IDGA (MEAS et al., 2000). Entretanto, Molnár et al. (2000) avaliaram 568 amostras de soro bubalino e encontraram 24,6% dos animais reagentes para o mesmo teste.

Na espécie bovina, são verificados valores maiores que a bubalina para ocorrência da LEB. Cerca de 27,6% dos bovinos criados em diversas regiões do Brasil estão afetados pela doença (BIRGEL JUNIOR et al., 2006). Fato também verificado no Pará, em que a prevalência da doença em bovinos, encontrada por Mólnar et al. (1999) foi de 26,0% (174/668) pela IDGA.

De acordo com Nascimento e Carvalho (1993), o búfalo tem como característica a maior resistência às enfermidades, o que pode explicar a baixa ocorrência da leucose nessa espécie se comparada com a bovina. Para Molnar et al. (2000), essa diferença na soropositividade da LEB pode se justificar pelas prováveis diferenças entre bovinos e bubalinos na síntese, quantidade e persistência de imunoglobulinas.

Embora a ocorrência de infecção natural em búfalos esteja constatada (MARÍN et al., 1978; MOLNÁR et al., 2000; CHAVES et al., 2012a), poucos estudos têm sido publicados sobre a susceptibilidade dos búfalos à leucose bovina.

Romero et al. (1981) estudaram a infecção experimental da LEB em 14 búfalos e destes, quatro animais apresentaram anticorpos específicos para a glicoproteína gp55 do VLB, detectados através da imunodifusão entre três a oito meses após inoculação. Neste mesmo estudo foi possível observar partículas virais nos vacúolos citoplasmáticos de leucócitos pela microscopia eletrônica em todos os animais soropositivos após oito meses da inoculação.

Os mesmos autores sugerem a menor susceptibilidade dos búfalos à infecção pelo VLB em relação aos bovinos, já que ambas espécies foram desafiadas à infecção através de inoculo de vírus em cultura de células e sangue de bovinos infectados, e somente os bovinos se infectaram em ambas as situações.

Em outro estudo experimental, Persechino e D'Amore (1984) verificaram que a soroconversão ao vírus da LEB ocorreu aos 19 meses pós-inoculação, no entanto, não foram

demonstradas alterações no número de linfócitos ou linfadenopatia que pudesse sugerir linfocitose persistente ou linfossarcoma.

Del Fava et al. (1999) observaram reação sorológica fracamente positiva à IDGA de uma búfala 24 semanas pós-inoculação e esta se manteve durante o período de 52 semanas, não ocorrendo linfocitose persistente e linfossarcoma.

De acordo com Molnar et al. (2000), várias questões referente a leucose precisam ser elucidadas: se as cepas de vírus que circulam nos búfalos são totalmente idênticas às de bovinos. Se a infecção se manifesta por alterações clínicas e patológicas na espécie.

5.2 DIARREIA VIRAL BOVINA

No presente estudo 53,71% dos bubalinos foram reagentes para o vírus da Diarreia viral bovina, resultado semelhante ao obtido por Lage et al. (1996) em inquérito sorológico realizado em Minas Gerais, que obteve 52,7% de bubalinos com anticorpos contra o mesmo vírus utilizando o teste de soro-neutralização.

Os resultados da presente pesquisa também se aproximam dos verificados em estudo feito no Egito em várias espécies em que a prevalência de anticorpos neutralizantes para o vírus da BVD em búfalos foi de 52% (ZAGHAWA, 1998). Entretanto, no presente estudo, o resultado foi superior ao encontrado por Pituco, Del Fava e Okuda (1997) em rebanhos bubalinos com problemas reprodutivos no Estado de SP no Vale do Ribeira (16,2%), além de uma pesquisa no Irã em que 33,9% dos búfalos foram reagentes para BVDV na SN (HAJI HAJIKOLAEI; SEYFIABAD SHPOURI; LOFTI, 2010).

O valor obtido neste estudo para doença (53,71%) em bubalinos para o BVD é superior a ocorrência nacional para bovinos (47,7%) (PITUCO; DEL FAVA, 1998), assim como ao valor verificado em 378 zebuínos da raça Nelore no Estado do Pará que detectou anticorpos anti-BVD em 40,21% dos animais (KZAM, 2013).

A maior incidência da doença em bubalinos também foi verificada na Índia por Sudharshana, Suresh e Rajasekha (1999) em que a prevalência média de anticorpos contra o BVDV em bovinos foi 15,29% (50/ 327) enquanto em búfalos 23,21%.

Apenas uma propriedade não apresentou animais reagente para o vírus da Diarreia viral bovina, demonstrando a elevada ocorrência do vírus nas propriedades avaliadas.

De acordo com Radostits et al. (2002), a prevalência da infecção nos animais acima de um ano é alta, deste modo, 60 a 80% de animais nessa idade possuem anticorpos neutralizantes séricos para o BVDV, fato que corrobora com este estudo em que se notou um

aumento da ocorrência de anticorpos neutralizantes com o avançar da idade (Tabela 3). Até um ano de idade, menos da metade dos animais, ou seja, 40,32% (25/62) foram reagentes para BVD, enquanto que 78,79% (26/33) dos animais acima de oito anos foram reagentes ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para diarreia viral bovina de acordo com a faixa etária em bubalinos criados no Estado do Pará.

Resultado	Faixa etária			
	Até 1 ano	2-3 anos	4-7 anos	A partir de 8 anos
Reagente	40,32% (25/62) ^a	50% (54/108) ^{a,b}	56,46% (83/147) ^{b,c}	78,79% (26/33) ^c
Não reagente	59,68% (37/62)	50% (54/108)	43,54% (64/147)	21,21% (7/33)

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

$$\chi^2 = 13,8628; p = 0,0031$$

O crescimento nos índices de soropositividade de acordo com a idade podem ser explicados pelo fato de animais na idade adulta serem expostos a fatores estressantes, como transporte, o pico de atividade produtiva e reprodutiva, tornando-os susceptíveis a enfermidades de etiologias diversas, além disso, quanto maior a idade do animal, maiores são as chances de exposição ao agente (CHAVES et al., 2010, CHAVES et al, 2012b).

Em relação ao sexo, percebeu-se uma positividade para BVD maior em machos como demonstrado na Tabela 4, havendo diferença estatística para a doença em relação ao sexo.

Tabela 4 - Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para diarreia viral bovina de acordo com o sexo em bubalinos criados no Estado do Pará.

Resultado	Bubalinos	
	Macho	Fêmea
Reagente	72,61% (114/157)	38,54% (74/192)
Não reagente	27,39% (43/157)	61,46% (118/192)

$$\chi^2 = 40,34; p = 0,0001$$

Em um estudo no Irã com 310 búfalos, 105 (33,9%) foram reagentes no teste de soroneutralização e, destes, a maioria eram fêmeas (39,5%) e 27,78 % machos (HAJI HAJIKOLAEI; SEYFIABAD SHPOURI; LOFTI, 2010), discordando dos resultados encontrados no presente estudo.

Observou-se que a maioria dos animais procedentes do municípios do Marajó (90,48%) foram reagentes para BVD (Tabela 5), o que pode ser explicado pelo tipo de criação, já que a maioria dos rebanhos analisados no Marajó eram criados de forma extensiva, que para Quincozes et al., (2007) esse tipo de criação apresenta 2,77 vezes mais chances de apresentarem soropositividade para o BVDV em relação a rebanhos com criação semi-extensiva.

Tabela 5 - Frequência (%) de bubalinos reagentes e não reagentes para diarreia viral bovina de acordo com a procedência.

Resultado	Bubalinos	
	Marajó	Belém e Nordeste paraense
Reagente	90,48% (114/126)	33,04% (74/224)
Não reagente	9,52% (12/126)	66,96% (150/224)

$$\chi^2 = 107,01; p = 0,001$$

É possível que a maior prevalência observada nas propriedades de criação extensiva deva-se a inexistência ou a realização de um número muito reduzido de medidas direcionadas para o controle de problemas sanitários.

Dentre os fatores de risco investigados para associação com a ocorrência de anticorpos anti-VBVD nos bubalinos pertencentes aos rebanhos de Belém e Nordeste Paraense, somente o tipo de ordenha foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$), cujo *Odds Ratio* (OR = 0,0427) (Tabela 6).

Tabela 6 - Fatores de risco associados a soropositividade para BVD nas propriedades localizadas em Belém e Nordeste Paraense.

Fator de risco	P-valor	OR	ARR	NNT
Sistema de Produção	0,6082	0,8049	4,46%	23
Ordenha	0,0001	0,0427	49,99%	3
Forma de reprodução	0,8529	1,1170	2,27%	45
Presença de bovinos	0,8529	1,1170	2,27%	45

Em que OR=, valor de *Odds Ratio*; ARR=,Risco absoluto; NNT= número necessário para

Isto significa que a probabilidade para ocorrência de BVD na propriedade com ordenha manual é cerca de 0,04 vezes superior à propriedade com ordenha mecânica, fato verificado por Chaves et al. (2012b) que constataram frequências mais elevadas nas propriedades que realizavam ordenha manual (67%).

Samara et al. (2004), concluíram que as maiores ocorrências de animais reagentes ao BVDV são encontradas em propriedades menos tecnificadas, corroborando com os resultados desse estudo. Entretanto, estudo sobre a ocorrência da BVD em bovinos do Rio Grande do Sul discordou da presente pesquisa, pois o uso de ordenha mecânica resultou em um risco 2,34 vezes maior de o rebanho apresentar a infecção, comparado ao uso de ordenha manual (QUINCOZES et al., 2007).

De acordo com Quincozes et al. (2007), embora não existam relatos da utilização de ordenha como sendo fator de risco para a infecção por BVDV, esta variável pode ser considerada, já que está associada à aglomeração de animais e, desse modo, pode aumentar a probabilidade de transmissão do vírus.

A partir do valor encontrado de NNT (3), pode-se afirmar que seriam necessários três indivíduos expostos ao fator de risco (ordenha) para num período de dez anos surgir um novo caso da doença.

Apesar de não ter sido estatisticamente significativo neste estudo, o sistema de produção tem sido considerado fator de risco para BVD, em que propriedades com maior densidade de animais (sistema intensivo) tem maior predisposição para a infecção (SAA et al., 2012). Entretanto, em estudo realizado por Quincozes et al. (2007), as propriedades do tipo

extensivo apresentaram 2,77 vezes mais chances de haver sorologia positiva para o BVD em relação a rebanhos com criação semi-confinada.

Por outro lado, de acordo com Talafha et al. (2009), rebanhos de médio porte e grande porte apresentam risco maior para disseminação da infecção do que rebanhos menores.

No estudo feito por Quincozes et al. (2007), levando em conta o tipo de exploração, a exploração mista (corte e leite) apresentou prevalência de 77,24% e 1,73 e 2,98 vezes mais chance de apresentarem animais positivos para BVD do que propriedades com exploração exclusiva de corte ou de leite, respectivamente; o tipo de exploração não pôde ser avaliado no presente estudo, já que todas as propriedades em que foi realizado o questionário eram de caráter misto.

Segundo estudo feito por Chaves et al. (2012b), propriedades que utilizam monta natural (MN) como forma de reprodução tem risco aumentado para BVD, ao comparar com propriedades que utilizam somente inseminação artificial, isto porque a utilização da técnica com sêmen previamente testado e sabidamente livre de vírus pode ser considerada um fator de controle desta infecção. Para Quincozes et al. (2007), propriedades que utilizam como forma de reprodução somente touro, representou chance 1,90 vezes maior de presença da infecção, enquanto que o uso de inseminação e touro representou chance 2,08 maior. Na presente pesquisa, esse fator também não foi significativo.

O contato com outras espécies susceptíveis à BVD é considerado fator associado à ocorrência da infecção. Propriedades que criam bovinos concomitantemente com ovinos tiveram chances 1,48 vezes maior de apresentarem a infecção do que propriedades que não criam ovinos (QUINCOZES et al., 2007). Entretanto, no estudo de Chaves et al. (2012b) esse fator não foi considerado significativo, corroborando com o presente estudo.

Outro fator de risco para BVD é a ausência de assistência veterinária na propriedade (QUINCOZES et al., 2007; CHAVES et al., 2012b). Na presente pesquisa, todas as propriedades recebiam assistência veterinária de acordo com os proprietários.

5.3 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA

A frequência de sororeagentes contra o vírus da IBR (91,71%) foi semelhante a encontrada por Ferreira et al. (2010), de 82,4% (155/188) em touros bubalinos criados em sistema extensivo no Estado do Amapá e Ilha de Marajó no Estado do Pará através da soroneutralização e superior aos resultados de Moura et al. (2005) em rebanhos bubalinos

localizados nos Municípios de Cachoeira do Arari, Soure, Nova Timboteua, Ipixuna e Moju, localizados no Estado do Pará, que verificaram positividade em 76,48% pelo teste ELISA.

Uma incidência de 57,82% também em bubalinos no Município de Soure, na Ilha de Marajó, Pará foi encontrada por Reis (2008), resultado inferior ao da presente pesquisa.

Os resultados verificados no presente estudo foram muito superiores ao inquérito sorológico realizado em Minas Gerais que detectou 14,7% dos bubalinos com anticorpos contra herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) por soro-neutralização (LAGE et al., 1996). Essa diferença pode estar relacionada ao tipo de população utilizada, ao uso de diferentes técnicas de amostragem, à origem e ao manejo dos animais testados e por diferenças regionais (LOVATO et al., 1995; GUIMARÃES et al., 2000).

A alta ocorrência observada para a infecção pelo BoHV-1 é preocupante, pois as propriedades estudadas não adotam a vacinação em seu manejo sanitário e, portanto, os anticorpos encontrados, não são de origem vacinal. Entretanto, apesar da alta taxa de animais reagentes, evidências clínicas de infecção não foram detectadas nas propriedades.

Estudos feitos por Scicluna et al. (2010), relatam que o búfalo, apesar de não apresentar a sintomatologia de IBR, desempenha importante papel epidemiológico, pois é um potencial hospedeiro heterológico dos vírus para bovinos em regiões onde há criação de ambas as espécies.

O valor verificado na presente pesquisa para a ocorrência de IBR em bubalinos (91,71%) é bem superior ao verificado por Richtzenhain et al. (1999) em que 64,3% das amostras de bovinos procedentes de 21 estados brasileiros foram reagentes no ELISA. O resultado também é maior que valores encontrados na espécie bovina no Estado do Pará, de 33,5% (COSTA et al., 2012) e 79,72% (SOUZA, 2014).

No presente estudo foi observada a presença de animais sororeagentes em todas as 15 propriedades estudadas e, portanto, em todos os municípios estudados, o que para Sousa et al. (2013) indica que a infecção está amplamente distribuída na região estudada.

A ausência de vacinação, a compra de animais sem a realização de testes sorológicos prévios, a não realização de testes sorológicos regulares no rebanho, a compra de sêmen de centrais de touros não testados para IBR e a presença de touros e vacas com idade elevada são alguns dos fatores que, provavelmente contribuíram para os altos índices da doença na região estudada.

Em relação a faixa etária verificou-se que 93,94% dos animais com idade superior a oito anos foram reagentes para IBR como pode ser observado na Tabela 7. Entretanto, não houve diferença significativa ($p=0,4049$).

Tabela 7 - Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para rinotraqueíte infecciosa bovina de acordo com a faixa etária em bubalinos criados no Estado do Pará.

	Faixa etária			
	Até 1 ano	2-3 anos	4-7 anos	A partir de 8 anos
Reagente	93,55% (58/62)	87,97% (95/108)	93,20 % (137/147)	93,94% (31/33)
Não reagente	6,45% (4/62)	12,04 % (13/108)	6,80% (10/147)	6,06%(2/33)

$$\chi^2 = 2.9149; p = 0,4049$$

Os resultados deste estudo corroboram com Sarumathi, Reddy e Sreedevi (2002) que relataram em bubalinos da Índia incidência bastante elevada nos animais a partir de seis anos. Entretanto, discorda do estudo feito por Singh et al. (2006) em 472 amostras, cujo bubalinos jovens, com menos de três anos de idade foram mais susceptíveis a infecção pelo HBV-1 do que as outras faixas de idade.

Ferreira et al. (2010) verificou que bubalinos pertencentes à faixa etária de até dois anos de idade apresentaram as menores prevalências para IBR e os touros com idade superior a três anos demonstraram positividade maior na sorologia para a IBR.

Deste modo, é importante ressaltar que animais mais velhos têm maior probabilidade de ser infectado pelo pico das atividades produtivas e maior tempo de exposição ao vírus (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005; BOALAERT et al., 2005).

Em relação ao sexo, embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, observou uma positividade para IBR de 89,81 nas fêmeas e 93,75% nos machos como verificado na Tabela 8. No estudo de Barbosa, Brito e Alfaia (2005) e Boalaert et al. (2005), os machos foram mais frequentemente infectados que as fêmeas.

Tabela 8- Frequência (%) de animais reagentes e não reagentes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina de acordo com o sexo em bubalinos criados no Estado do Pará.

Resultado	Bubalinos	
	Macho	Fêmea
Reagente	89,81% (141/157)	93,75% (180/192)
Não reagente	10,19% (16/157)	6,25% (12/192)

$$\chi^2 = 1,818; p = 0,1776$$

Ao comparar a ocorrência da IBR com a procedência dos bubalinos, verificou-se uma soropositividade maior nos animais procedentes de propriedades de Belém e Nordeste paraense (95,98%) do que do Marajó (84,13%), como verificado na Tabela 9.

Tabela 9 - Frequência (%) de bubalinos reagentes e não reagentes para rinotraqueíte infecciosa bovina de acordo com a procedência.

Resultado	Bubalinos	
	Marajó	Belém e Nordeste paraense
Reagente	84,13% (106/126)	95,98% (215/224)
Não reagente	15,87% (20/126)	4,02% (9/224)

$$\chi^2 = 14,91; p = 0,001$$

Pesquisas demonstram que quanto mais denso o rebanho maior a disseminação da rinotraqueíte infecciosa bovina na propriedade (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005; BOALAERT et al., 2005; DIAS et al., 2008), o que pode justificar a maioria de animais sororeagentes para a infecção serem procedentes de propriedades localizadas em Belém e no Nordeste paraense, visto que estas propriedades são na maioria de caráter semi-intensivo.

Dentre os fatores de risco investigados para associação com a ocorrência de anticorpos anti-BoHV-1 nos bubalinos pertencentes aos rebanhos de Belém e Nordeste Paraense, somente o tipo de sistema de produção foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$), cujo *Odds Ratio* (OR = 0,1068) (Tabela 10).

Tabela 10 - Fatores de risco associados a soropositividade para IBR nas propriedades localizadas em Belém e Nordeste Paraense.

Fator de risco	P-valor	OR	ARR	NNT
Sistema de Produção	0,0331	0,1068	6,88%	15
Ordenha	0,3502	2,8105	3,74%	27
Forma de reprodução	0,1231	6,1429	5,52%	19
Presença de bovinos	0,1231	6,1429	5,52%	19

Em que OR=, valor de *Odds Ratio*; ARR=,Risco absoluto; NNT= número necessário para

De acordo com os resultados encontrados, a probabilidade para ocorrência de IBR em propriedades com sistema de produção semi intensivo é cerca de 0,1068 vezes superior às propriedades com sistema de produção extensivo, fato verificado por Chaves et al. (2012b) que constataram frequências mais elevadas nas propriedades com esse tipo de sistema (67%). Resultado semelhante também ao encontrado por Solis-Calderon et al., (2003) em que rebanhos com altas densidades obtiveram maiores chances de soropositividade para IBR.

Apesar das variáveis ordenha, forma de reprodução e presença de outras espécies terem sido citadas como fator de risco para a doença por diferentes autores (BOELAERT et al., 2000; VAN SCHAİK et al., 2001), neste estudo, não foi verificada significância estatística para esses fatores.

Em relação ao tipo de ordenha, embora não tenha sido significativo na presente pesquisa, esta variável pode ser considerada fator de risco para a infecção, visto que propicia a aglomeração de animais e, conseqüentemente, uma maior probabilidade de transmissão do vírus.

Segundo Dias et al. (2008), a utilização da monta natural como método de reprodução envolveria maior probabilidade de infecção comparada à inseminação artificial, já que nas centrais de inseminação artificial, normas de controle sanitário são exigidas com o objetivo de garantir a ausência de microrganismos patogênicos no sêmen, entretanto, nesta pesquisa o tipo de reprodução não mostrou ser um fator de risco para a infecção do BoHV-1, corroborando com Van Schaik et al. (1998).

De acordo com Van Schaik et al. (1998), o contato com outras espécies animais podem atuar como transmissores mecânicos do vírus quando se deslocam de um local a outro

dentro e entre propriedades, entretanto, esta variável não foi considerada significativa no presente estudo.

A não associação da infecção com os fatores estudados pode ter ocorrido pelo fato de que a maioria das propriedades, independente de utilizar a inseminação artificial ou monta natural na reprodução, de ordenhar ou não os animais, de criar concomitantemente outras espécies ou não, demonstrou coeficientes bastante elevados de positividade.

Ressalta-se, ainda, que 48,28% (169/350) dos animais apresentaram-se sororeagentes para as duas doenças (IBR e BVD), deste modo, o forte grau de associação positivo encontrado entre as duas viroses pode ser explicado pelo efeito imunodepressor do BVDV propiciando a ocorrência de infecções pelo BoHV-1 ou desencadeando ativação do vírus da IBR em animais com infecção latente (BIUK -RUDAN et al., 1999; SOUSA et al., 2013).

Potgieter (1995) demonstrou evidências experimentais da interação do BVDV com outros patógenos, principalmente o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), estudando a permanência do vírus HVB-1 após inoculação em tecidos do trato respiratório de bezerros saudáveis e bezerros infectados com o BVDV.

6. CONCLUSÕES

- A presença de anticorpos contra VBLV não foi verificada na população estudada.
- A presença de anticorpos contra VBVD e BoHV-1 foi constatada na população estudada, sendo significativamente elevada para BoHV-1;
- Bubalinos machos e animais com idade mais avançada apresentam maior soropositividade para BVD.
- A frequência de bubalinos sororreagentes para BVD é maior na Mesorregião do Marajó, em relação às Mesorregiões Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém;
- A frequência de bubalinos sororreagentes para IBR é maior na Mesorregião Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém em relação à Mesorregião do Marajó.
- Dentre as variáveis investigadas, o tipo de ordenha foi o único identificado como fator de risco para a ocorrência da BVD em bubalinos criados nas Mesorregiões Nordeste Paraense e Metropolitana de Belém.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V. L. V., et al. Prevalência da leucose enzoótica bovina nos estados de Rondônia e Acre. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 42, n. 3, p. 203-210, 1990.
- ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **Am. J. Vet. Res.**, v. 43, n.1, p.36-40, 1982.
- ADLAKHA, S. C.; SHARMA S. N. Infectious diseases. p. 271-297 In: TULLOH N.M.; HOLMES, J. H. G. (Eds.), **Buffalo Production**. Elsevier, Amsterdam. 1992.
- AKÇA, Y., et al. A study on investigation of occurrence of some virus infection in Buffaloes in Turkey. **Revue Méd. Vét.**, v. 156, n. 5, p. 268-271.
- ALBUQUERQUE, M. S. M., et al. **Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: uma revisão da literatura**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 23 p.
- ANDRADE, J. R. A; ALMEIDA, M. M. R. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina na Bacia Leiteira de Goiânia, Goiás. **Hora Vet.**, v. 10, n. 60, p. 49-53, 1991.
- AQUINO, S. M., et al. Progression of an orbital T-cell rich B-cell lymphoma to a B-cell lymphoma in a dog. **Vet. Pathol.**, v. 37, n. 5, p. 465-469, 2000.
- AZEDO, M. R., et al. Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.
- BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN, H. L.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Vet. Microb.**, v. 53, n.1-2, p. 31-42, 1996.
- BAKER J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet. Clin. North Am.**, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.
- BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, 2005.
- BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Diag. microbiol.** 9. ed. St. Louis: Mosby, 1994. 958 p.
- BARROS FILHO, I. R., et al. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. 3, p. 511-515, 2010.
- BASHIR, S., et al. Development of a sandwich ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1. **Asian Pacif. J. Trop. Med.**, v. 4, n. 5, p. 363-366, 2011.
- BASÍLIO, M. L. F., et al. Inquérito soropidemiológico da leucose enzoótica bovina em ovinos (*Ovis aries*) no Brasil. **O biol.**, v. 68, n. 1/2, p. 29-86, 2006.

BAUERMAN, F. V. **Emergência do grupo de pestivírus hobi-like e impacto no diagnóstico e controle do vírus da diarreia viral bovina**. 2013. 117 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

BEER, J. **Doenças Infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1999. p 89-93

BEZERRA, D. C., et. al. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da região amazônica maranhense. **Arq. Inst. Biol.**, v. 79, n. 1, p. 107-111, 2012.

BIELEFELT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection: A window on the pathogenesis. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 11, n. 3, p. 447-476, 1995.

BIRGEL, E. H. Leucose Enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia Clínica Veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária. 1982. p. 249-60.

BIRGEL JÚNIOR, E. H., et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 15, n. 4, p. 93-99, 1995.

BIRGEL JUNIOR, E. H., et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Simental, criados no Estado de São Paulo. **Ars vet.**, v. 22, n. 2, p. 122-129, 2006.

BIUK-RUDAN, N., et al. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenol.**, v. 51; n. 5, p. 875-881, 1999.

BLAS-MACHADO, U., et al. Bovine viral diarrhea virus type 2 – induced meningoencephalitis in a heifer. **Vet.Pathol.**, v. 41, n. 2, p.190-194, 2004.

BOABAID, F. M. **Achados clínicos e Patológicos da leucose bovina enzoótica**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2011.

BOELAERT, F., et al. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Prev. Vet. Medic.**, v. 69, n. 3/4, p. 285-295, 2005.

BOTTON, S. A., et al. Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 83-90, 1998.

BRAGA, A. C., et al. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina em animais da raça leiteira Importados do Uruguai. **Pesq. Agrop. Gaúcha.**, v. 4, n. 1, p. 35-38, 1998.

BRITO, W. M. E. D., et al. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em fêmeas de rebanhos leiteiros não vacinados, com histórico de problemas reprodutivos, no estado de Goiás. **Rev. Patolog. Tropical**. v. 33, n. 1, p. 45-53, 2004.

BROCK, K. V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2004.

BRODERSEN, B.W. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 20, n. 1, p. 85-93, 2004.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.**, v. 9, n. 1, p. 43-59, 1990.

BRUM, M. C. S., et al. Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas prenhes imunizadas com duas amostras de vírus atenuadas experimentalmente. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 22, n. 2, p. 64-72, 2002.

BURNY, A., et al. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leucosis. **Ondestepoort. J. Vet. Res.**, v. 52, n. 3, p. 133-144, 1985.

CAMARGOS, M. F., et al. Testes de diagnóstico para o vírus da leucemia bovina. **Rev. Bras. Cien. Vet.**, v. 12, n. 1/3, p. 149-150, 2005.

CAMARGOS, M. F. **Padronização de uma PCR para diagnóstico da Leucose Enzoótica bovina e sequenciamento parcial do gene env.** 2001. 38 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.

CARNEIRO, P. A. M., et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.**, v. 33, n. 1, p. 111-125, 2003.

CASTRO, R. S., et al. Anticorpos contra pestivírus e herpesvírus em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 46, n. 5, p. 577-578, 1994.

CAVALCANTE, F. A. **Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Estado do Acre.** Rio Branco: Embrapa 1997. 3p.

CERQUEIRA, R. B., et al. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 37, n. 6, p. 497-500, 2000.

CHAVES, N. P., et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 2, p. 131-134, 2012a.

CHAVES, N. P., et al. 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. **Ciênc. Rur.**, v. 40, n. 6, p. 1448-1451, 2010.

CHAVES, N. P., et al. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em bovinos leiteiros não vacinados no Estado do Maranhão. **Arq. Inst. Biol.**, v. 79, n. 4, p. 495-502, 2012b.

CHÉNIER, S.; MONTPETIT, C.; HÉLIE, P. Caprine herpesvirus-1 abortion storm in a goat herd in Quebec. **Can. Vet.J.**, v. 45, n. 3, p. 241- 243, 2004.

CHIBA, T., et al. Immunohistologic Studies on Subpopulations of Lymphocytes in Cattle with Enzootic Bovine Leukosis. **Vet. Pathol.**, v. 32, n. 5, p. 513-520, 1995.

CHOW, T. L.; MOLELLO, J. A.; OWEN, N. V. Abortion experimentally induced in cattle by infectious bovine rhinotracheitis virus. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 144, n. 1, p. 1005-1007, 1964.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843 p.

COSTA, C. A., et al. Prevalência de anticorpos para BVD (Diarréia Viral Bovina) e IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina) em vacas Nelore no Sudeste do Pará. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2012, Fortaleza- CE. **Anais..**, 2012, p 245.

CRAIG, M. I., et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Res. Vet. Sci.**, n. 85, v. 1, p. 194–196, 2008.

D'ANGELINO, J. L. **Leucose enzoótica dos bovinos. Estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados**. 1991.85 f. Tese (Livredocência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

D'ARCE, R. C. F., et. al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Vet. Microb.**, v. 88, n. 4, p. 315-324, 2002.

DEKA, D., et al. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, v. 24, n. 3, p.1085-1094, 2005.

DEL FAVA, C., et al. Occurrence of seropositive sheep (*Ovis aries*) to Bovine Leukemia Virus in Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 47, n. 6, p. 483-487, 2010.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. Infecção pelo vírus da leucemia bovina no Brasil. **O Biol.**, v. 66, n. 1/2, p. 1-8, 2004.

DEL FAVA, C. **Rinotraqueíte Infecciosa Bovina**. Piracicaba: FEALQ, 1996 (Boletim Técnico).

DEL FAVA, C., et al. Alguns aspectos da infecção experimental pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) e ovinos (*Ovis aries*). **Ars Vet.**, v. 15, n. 1, p. 33-38, 1999.

DEL FAVA, C., et al. Prevalence of enzootic bovine leukosis among buffaloes *Bubalus bubalis* in the Ribeira valley region state of Sao Paulo, Brazil. **Ind. J. of Ani. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 10-11, 1997.

DEQUIEDT, F., et al. Mutations in the p53 Tumor-suppressor gene are frequently associated with bovine leukemia virus-induced leukemogenesis in cattle but not in sheep. **Virol.**, v. 209, n. 2, p. 676-683, 1995.

DEREGT, D.; LOEWEN, K. G. Bovine viral diarrhea virus - biotypes and disease. **The Can. Vet. J.**, v. 36, n. 6, p. 371-378, 1995.

DERSE, D. Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virusencoded *trans*-acting factor and by *cis*-acting response elements. **J. Virol.**, v. 61, n. 8, p. 2462-2471, 1987.

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 40, n. 3, p. 161-168, 2003.

DIAS, J. A., et al. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n. 3, p.161-168, 2008.

DIGIACOMO, R. F. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. **Vet. Med.**, v. 87, n. 3, p. 248-257, 1992.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Vet. Clin. North Am.**, v. 11, n. 3, p. 393-423, 1995.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologic.**, v. 41, n. 1, p. 8-13, 2013.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet Microbiol.**, v. 53, n.1-2, p. 3-15, 1996.

EVERMANN, J. F. A look at how bovine leukemia vírus infection is diagnosed. **Vet. Med.**, v.87, n. 3, p. 272-278, 1992.

EVERMANN, J. F., et al. Transmission of bovine leukosis vírus by blood inoculation. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, n. 9, p. 1885-1887, 1986.

FENNER, J. F.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. **Veterinary Virology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 2010. 528 p.

FERNANDES, C. H. C., et al. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região Norte do estado do Tocantins, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 3, p. 327-334, 2009.

- FERREIRA, R. N., et al. Prevalence of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in Buffalo Bulls in Amapá State and Marajó Island, Amazon Basin, Brazil. **Rev. Vet.**, v. 21, n. 1, p. 475, 2010.
- FIGHERA, R. A.; BARROS, C. S. L. Linfossarcoma intracerebral em bovino. **Ciê. Rur.**, v. 34, n. 3, p. 943-945, 2004.
- FIGUEIREDO, H. C. P., et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia bovina a vírus em Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n. 4, p. 11-15, 1997.
- FINO, T. C. M., et al. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.36, n.2, p.122-127, 2012.
- FLORES, E. F. Vírus da diarreia viral bovina. **Arq. Inst. Biol.**, v.65, n.1/2, p.3-9, 2003.
- FLORES E. F., et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Res.**, v. 87, n. 1, p. 51-60, 2002.
- FLORES, E. F., et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.
- FRANDOLOSO, R., et al. Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região Nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciê. Anim. Bras.**, v. 9, n. 4, p. 1102-1106, 2008.
- FRAY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60, n. 61, p. 615-627, 2000.
- FRY, M. M.; MCGAVIN, M. D. Doenças da medula óssea, células sanguíneas e sistema linfático In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia veterinária**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 743-780.
- FULTON, R. W., et al. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1^a, 1 b and 2^a in persistently infected cattle entering a feedlot. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 228, n. 4, p 578-584, 2006.
- GARCIA, M., et al. Concentração sérica de gamaglobulinas em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Ars Vet.**, v. 18, n. 1, p. 62-66, 2002.
- GOENS, D. The evolution of Bovine Viral Diarrhea: a review. **Can. Vet. J.**, v. 43, n.12, p. 946-954, 2002.
- GONZÁLEZ, E. T., et al. Enzootic bovine leukosis: development of an indirect enzyme linked Immunosorbent assay (I-ELISA) in seroepidemiological studies. **Rev. Microb.**, v. 30, n. 1, p. 37-42, 1999.
- GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 20, n. 1, p. 5-19, 2004.

GUIMARÃES, P. L. S. N., et al. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em bovinos do entorno de Goiânia, em regime de criação semi-extensivo. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.1, n.2, p. 137-142, 2000.

HAFEZ , S. M., et al. Serological survey for the prevalence of antibody to rotavirus and Bovine Leukemia virus amongst buffaloes and cattle in Egypt. **Bull. Off. Int. Epiz.**, v. 92, n. 11/12, p. 1193-1203, 1980.

HAGE, J. J., et al. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. **Prev. Vet. Med.**, v. 34, n.2/3, p. 97-106, 1998.

HAJI HAJIKOLAEI, M. R.; SEYFIABAD SHPOURI, M. R.; LOFTI, M. Serological study of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Ahvaz in the southwestern region of Iran. **Intern.Journ. Vet. Res.**, v. 4, n. 1, p. 45-48, 2010.

HAMBLIN, C., et al. Antibodies to some pathogenic agents in free-living wild species in Tanzania. **Epidemiol. Infect.**, v. 105, n. 3, p. 585-594, 1990.

HAMERS, C., et al. Diversity among bovine pestiviruses. **Vet. J.**, v. 161, n.2, p.112-122, 2001.

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

HOPKINS, S. G., et al. Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. **Vet. Rec.** v. 122, n. 16, p. 389-391, 1988.

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

HOUE, H.; PEDERSEN, K. M.; MEYLING, A. The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate. **Prev. Vet. Med.**, v.15, n. 2/3, p.117- 123, 1993.

HÜBNER, S. O., et al. Infecção intra-uterina pelo vírus da leucose bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n. 4, p. 8-11, 1997.

IBGE, **Censo Agropecuário** de 2010, Brasil. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>. Acesso em 25 mai. 2012.

JACOBSEN, K. L., et al. Transmission of bovine leukemia virus: Prevalence of antibodies in precolostral calves. **Prev. Vet. Med.**, v. 1, n. 3, p. 265-272, 1983.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Vet. Bullet.**, v. 62, n. 4, p. 287-314, 1992.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000.1415 p.

JUNQUEIRA, J. R. C., et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina. Cienc. Agr.**, v. 27, n. 3, p. 471-480, 2006.

KAHRS, R. F. **Viral diseases of cattle**. 2.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2001. p. 159-170.

KERKHOFS, P., et al. In Vitro and In Vivo Oncogenic Potential of Bovine Leukemia Virus G4 Protein, **J. Virol.**, v. 72, n. 3, p. 2554–2559, 1998.

KLINTEVALL, K. et al. Differentiation between enzootic and sporadic bovine leukosis by use of serological and virological methods. **Vet. Rec.**, v. 133, n. 11, p.272, 1993.

KRAMPS, J. A., et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 9, p. 2175-2181, 1994.

KZAM, A. S. L. **Comparação de testes diagnósticos para detecção do Vírus da Diarreia Bovina e Brucella abortus em vacas de corte zebuínas da Mesorregião do Nordeste Paraense**. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2013.

LAGE, A. P., et al. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays.Trop.**, v. 49, n. 3, p. 195-197, 1996.

LEITE, R. C.; BASTIANETTO, E. Doenças infecciosas em búfalos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8, 2009, Belo Horizonte. **Anais. Palestras**. Supl.1, 11p.

LEUZZI JUNIOR, L. A.;ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzootica bovina e vírus da leucemia bovina. **Sem. Ciênc. Agr.**, v. 22, n. 2, p. 211-221, 2001.

LIMA, P. R. G. **Prevalência da leucose enzootica dos bovinos no Estado do Pará**. 1999.70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Belém, 1999.

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

LOVATO, L. T., et al. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc. Rur.**, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.

LUCAS, M. H.; ROBERTS, D. H.; WIBBERLEY, G. Ear tattooing as a method of spread of bovine leukosis virus infection. **Br. Vet. J.**, v. 141, n. 11, p. 647-649, 1985.

MAHMOUD, M.; NAHED, M.; ALLAM, M. Investigations on Infectious Bovine Rhinotracheitis in Egyptian Cattle and Buffaloes. **Glob. Vet.**, v. 3, n. 4, p. 335-340, 2009.

MANET, G., et al. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 22, n. 3, p. 255–263, 1989.

MARÍN, C., et al. Epidemiology of Bovine Leukemia in Venezuela. **Ann. Rech. Vet.**, v. 9, n. 4, p. 743-746, 1978.

MARTUCCIELLO, A., et al. Detection of Bovine viral diarrhea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Vet. Diagn. Invest.**, v. 21, n. 1, p. 137-140, 2009.

MASRI, S. A., et al. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Can. J. Vet. Res.**, v. 60, n. 2, p. 100-107, 1996.

MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR. E. D.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. **Braz. J. Vet. Res. Ani. Sci.**, v. 42, n. 3, p.171-180, 2005.

MEAS, S.; SETO, J., et al. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. **J.Vet. Med. Sci.**, v. 62, n. 3, p. 329–331, 2000.

MECHOR, G. D., et al. Protection of Newborn calves against fatal multisystemic Infectious Bovine Rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, n. 4, p. 452-459, 1987.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciênc Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350, 2000.

MEGID , J., et al. Ocorrência de Leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**,v. 55, n. 5, p.645-646, 2003.

MELO, C. B., et al. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, 2004.

MELO, C. B., et al. Prevalência de anticorpos contra herpesvírus bovino 1, vírus da diarréia bovina a vírus e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do Estado do Sergipe, Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Ani.**, v. 21, n. 2, p. 160- 161, 1997.

MELO, L. E. H., et al. Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos em rebanhos produtores de leite C, criados no Estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 3, 1999, São Paulo. **Anais**. Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo. v. 66, p.129.

MENDES, E. I., et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2011.

MERZA, M. S., et al. Bovine leukaemia virus ISCOMs: biochemical characterization. **Vacc.**, v. 7, n. 1, p. 22-28. 1989.

MINEO, T. W., et al. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 15, n.4, p. 188-192, 2006.

MIRSKY, M. L., et al. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **J.Virol.**, v. 70, n. 4, p. 2178-2183. 1996.

MOENNIG, V.; LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Prac.**, v.11, n.3, p.477-487, 1995.

MOLNÁR, E., et al. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 7-11, 1999.

MOLNÁR, E., et al. Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. **Vet. Rec.**, v. 146, n. 26, p. 705-706, 2000.

MOLTENI, A., et al. Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). **J. Vet. Med.**, v. 43, n. 4, p. 201-211, 1996.

MORAES, M. P., et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul. **Ciênc. Rur.**, v. 26 n. 2, p. 257-262, 1996.

MORATORIO, M. G., et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Arch. Virol.**, v. 155, n. 4, p. 481-489, 2010.

MOURA, A. C. B., et al. Ocorrência de bufalinos (*Bubalus bubalis*) sororeacionantes a los virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea bovina a virus, estomatitis vesicular y leucosis enzoótica de los bovinos, criados en La Amazônia Oriental. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE BUATRÍA, 12. 2005, Valdivia. Anales... Valdivia: 2005. p. 270-271.

MURPHY, F. A., et al. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999. 4495 p.

MUYLKENS, B., et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Res.**, v. 38, n. 2, p. 181-209, 2007.

NASCIMENTO, C.; CARVALHO, L. O. M. Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1993.

NISKANEN, R., et al. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. **Zentralbl. Veterinarmed B.**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1989.

NJAA, B. L., et al. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, n. 5, p. 393-399, 2000.

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**, p. 698-711, 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. Infectious Bovine Rhinotracheitis. Section 2.4, Chapter 2.4.13. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, p. 1-17, 2010.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. Infectious Bovine Rhinotracheitis. Section 2.4, Chapter 2.4.11. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, p. 1-11, 2008.

OKUDA, L. H., et al. Inquérito soro-epidemiológico do herpesvírus bovino tipo 1 (bohv-1) no Município de Monte Negro, Estado de Rondônia, Brasil. **Biolog.** v. 68, p. 157-159, 2006.

OLIVEIRA, A. P., et al. Epidemiologia da Leucose Bovina: Ocorrência de anticorpos em bovinos de várias faixas etárias. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 16, n. 6, p. 258-261, 1997.

OLIVEIRA, A. R., et al. Leucose bovina: Caracterização do proteinograma eletroforético em dois rebanhos identificados como soropositivos e com linfocitose persistente. **Arq. Inst. biol.**, v. 67, n. 1, 2000.

PACHECO, J. M. C. **Caracterização do perfil de risco e avaliação de práticas de biossegurança em explorações produtoras de leite.** 2010. 30 f. Dissertação (Programa em Medicina Veterinária) Universidade do Porto, Porto, 2010.

PASSLER, T., et al. Experimental persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in whitetailed deer. **Vet. Microbiol.**, v. 122, n. 3/4, p. 350-356, 2007.

PEIXOTO, T. C., et al. Leucose juvenil multicêntrica bovina - relato de caso. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 32, n. 1, p. 58-62, 2010.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virolog.**, v. 203, n. 2, p. 260-268, 1994.

PERINO, L. J., et al. Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, n. 8, p. 1167-1169, 1990.

PERSECHINO, A.; D'AMORE, L. Sulla recettività del búfalo al virus della Leucosi Bovina Enzoótica. Nota III. Trasmissione dell'infezione dal bufalo agli ovini. **Attid. Soc. Ital. Bui.**, v. 16, n. 25, p. 217-220, 1984.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C.; OKUDA, L. H. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia bovina a vírus (BVD) em búfalos (*Bubalus bubalis*) de rebanhos bubalinos com

problemas reprodutivos no Estado de SP no Vale do Ribeira, SP, Brasil. **Arqs Inst. Biol.**, v. 64, n. 1, p. 23-28, 1997.

PITUCO, E. M. **Aspectos clínicos, prevenção e controle da IBR.** 2009 (Boletim Técnico).

POLETTO, R., et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciênc. Rur.**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

PORTETELLE, D., et al. Detection of complement dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals. **Ann. Rech.Vet.**, v. 9, n. 4, p. 667-674, 1978.

POTGIETER, L. N. D. Immunology of bovine viral diarrhea virus. **Vet. Clin. North Amer. food anim. Pract.**, v. 11, n.3, p.501-520, 1995.

QUINCOZES, C. G., et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciênc. Agrar.**, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

RADOSTITS, O. M., et al. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.1737 p.

RAJÃO, D. S. **Efeito da infecção pelo vírus da leucose bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros.** 2008. 26 f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2008.

RAJÃO, D. S., et al. Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado de Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 32, n. 1,p. 42-45, 2010.

RAJESH, J. B.; TRESAMOL, P. V.; SASEENDRANATH, M. R. Seroprevalence of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) among cattle with different reproductive disorders. **Ind. J. Anim. Sci.**, v. 73, n. 9, p. 1047-1048, 2003.

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. Retroviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária.** Santa Maria: UFSM, 2007. p 809-837.

RENUKARADHYA, G. J.; RAJASEKHAR, M.; RAGHAVAN, R. Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis in southern India . **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 15, n. 3, p. 1021-1028, 1996.

REBHUN, W. C. **Doenças do Gado Leiteiro.** São Paulo: Roca, 2000. 654p.

RICHTZENHAIM, L. J. Em busca de respostas. **Rev. Criad.**, v. 808, n.1, p. 40, 1997.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S.; DUBOVI, E. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virolog.**, v. 205, n. 1, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biolog.**, v. 31, n.2, p.127-131, 2003.

RIET CORREA, F., et al. **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. v. 1, p. 159-169.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G; LEITE, R. C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciênc. Rural**, v. 29, n. 1, p. 373-380, 1999.

ROEHE P. M., et al. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no País. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria- RS. **Anais**..p.30-48, 1998.

ROIZMANN, B., et al. The family Herpesviridae: an update. **Arch. Virol.**, v. 123, n. 3/4, p. 425-49, 1992.

ROLA, J. Herpesviral infections as a cause of abortion in cattle and horses. **Zycie-Weter.**, v. 78, n. 5, p. 283-285, 2003.

ROMERO, C. H., et al. Bovine leukosis virus infectivity in Boophilus microplus ticks. **Vet. Rec.**, v. 115, n. 17, p. 440-441, 1984.

ROMERO, C. H., et al. Susceptibility of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) to Enzootic Bovine Leukosis Virus. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 1, n. 4, p. 137-140, 1981.

ROMERO, C. H., et al. Experimental transmission of enzootic bovine leukosis virus with blood and milk in the tropics. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 2, n. 1, p. 9-15, 1982.

SAA, L. R., et al. Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 44, n. 3, p. 645-649, 2011.

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Vet. Clin. Food Anim. Pract.**, v. 20, n.1, p. 69-83, 2004.

SAMARA, S. I.; DIAS.; F. C.; MOREIRA.; S. P. G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. sci.**, v. 41, n. 6, p. 396-40, 2004.

SANTOS, A. S., et al. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarréia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 10, p. 885-892 , 2011.

SANTOS, H. P. **Leucose enzoótica bovina: Estudo epidemiológico na bacia leiteira do estado do Maranhão e aperfeiçoamento do diagnóstico**. 2010. 87 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SANTOS, J. L., et al. Epidemiologia da Leucose Enzoótica Bovina no estado de Minas Gerais - Prevalência na Zona da Mata. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 37, n. 4, p. 359- 368, 1985.

SCHMITT, B.; HENDERSON, L. Diagnostic tools for animal diseases. **Rev. Sci. Tech.**, v. 24, n. 1, p. 243-250, 2005.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular Virology of ruminant herpes viruses. **Vet. Microbiol.**, v. 53, n. 1/2, p.17-29, 1996.

SARUMATHI, C.; REDDY, T. V.; SREEDEVI, B. A study on seroepizootiology of infectious bovine rhinotracheitis in Andhra Pradesh. **Indian J. Comparat. Microbiol., Immunol.**, v. 23, n. 1, p. 153-155, 2002.

SCHERER, C. F. C., et al. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 22, n. 2, p. 45-50, 2002.

SCHMITZ, M. Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina. **Acta Scient. Vet.**, v. 35, n. 2, p. 273-274, 2007.

SCHWARTZ, I. et al. In vivo leucocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **J. Virol.**, v. 68, n. 7, p. 4589-4596, 1994.

SCICLUNA, M. T., et al. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus infection? **Vet. Microbiol.**, v. 143, n. 1, p. 81-88, 2010.

SILVA, F. F., et al. Anticorpos neutralizantes contra o HVB-1 em bovinos do Estado de Pernambuco. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, n. 4, p.597-599, 1995.

SILVA, M. S. T., et al. **Programa de Incentivo a Criação de Búfalos por Pequenos Produtores** – PRONAF. Belem, PA: CPATU, 2003.

SILVA, R. C., et al. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na forma de linfossarcomas no distrito federal: Relato de caso. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, n. 4, p. 507-512, 2008.

SIMÕES, C. G. C. **Expressão imunoistoquímica de p53 e bcl-2 em casos de leucose enzoótica bovina**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Patologia experimental e comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SINGH, R., et al. Infectious bovine rhinotracheitis serosurveillance in Uttar Pradesh. **Journ. Immunol. Immunopathol.**, v. 8, n. 2, p. 49-51, 2006.

SHINAGAWA, T., et al. Characterization of monoclonal antibodies against Sporadic Bovines Leukosis cell lines. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 56, n. 5, p. 827-833, 1994.

SOLIS-CALDERON, J. J.; CORREA, V. M. S.; CORREA, J. C. S. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. **Prev. Vet. Med.**, v. 72, n. 3/4, p. 253-262, 2005.

SOUZA, D. C. **Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em fêmeas zebuínas nas Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense**. 2014. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2014.

SOUSA, V. E., et al. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 35, n. 1, p. 21-25, 2013.

SPIPKI, F. R., et al. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, n. 1, p.43-49, 2004.

SPONCHIADO, D. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da raça Holandesa Preta e Branca, criados no estado do Paraná.** 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SPRECHER, D. J., et al. An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhea virus in a dairy herd. **Theriogenol.**, v. 36, n. 4, p. 597- 606, 1991.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **Statistical analysis system user's guide: statistics.** Version 8.2, Cary: SAS Institute, 2001. 1686p.

STONE, D. M.; NORTON, L. K.; DAVIS, W. C. Spontaneously proliferating lymphocytes from bovine leukaemia virusinfected, lymphocytotic cattle are not the virus-expressing lymphocytes, as these cells are delayed in G0/G1 of the cell cycle and are spared from apoptosis. **J. Gen. Virol.**, v. 81, n. 4, p. 971-981, 2000.

STRAUB, O. C. Advances in BHV1 (IBR) Research. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v.108, n. 10, p.419-422, 2001.

SUDHARSHANA, K. J.; SURESH, K. B.; RAJASEKHAR, M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 18, n. 3, p. 667-671, 1999.

TAJIMA, S., et al. Function and conformation of wild-type p53 protein are influenced by mutations in bovine leukemia virus-induced B-cell Lymphosarcoma. **Virol.**, v. 243, n.1 , p. 235-246, 1998.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus Bovino Tipo 1: Tópicos Sobre a Infecção e Métodos de Diagnóstico. **Semina: Ciênc. Agr.**, v.22, n.2, p.203-209, 2001.

TALAFHA, A. Q., et al. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds in Jordan. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 41, n. 4, p. 499-506, 2009.

TÁVORA, J. P. F.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da Leucose Bovina em rebanhos leiteiros criados na região do polo Itabuna, Estado da Bahia. **Arq. EMV-UFBA**, v.14, n. 1, p. 164-183, 1991.

THIRY, J., et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Vet. Res.**, v. 37, n. 2, p. 169–190, 2006.

- THOMPSON, J. A., et al. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Prev. Vet. Med.**, v. 76, n.3/4, p. 290-301, 2006.
- TRUEBLOOD, M. S.; SWIFT, M. B. L.; MCHOLLAND-RAYMOND, L. A Bovine Herpesvirus Isolated from Sheep. **Can. J. Comp. Med.**, v. 42, n. 1, p. 97-99, 1978.
- TYLER, L. Enzootic bovine leukosis. **Vet. Rec.**, v. 53, n. 10, p. 194-198, 1978.
- TWIZERE, J.C., et al. Discordance between bovine leukemia virus tax immortalization In vitro and oncogenicity In vivo. **J. Virol.**, v. 74, n. 21, p. 9895-9902, 2000.
- VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M. Bovine Leukosis Virus In: MOREIN, B.; DINTER, Z. **Virus infections of ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science publishers, 1990. p. 419-429.
- VAN SCHAİK, G., et al. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. **Prev. Vet. Med.**, v. 54, n 3, p. 279-289, 2002.
- VAN SCHAİK, G., et al. Risk factors for existence of Bovine Herpes Virus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. **Prev. Vet. Med.**, v. 34, p. 2/3, p. 125-36, 1998.
- VAN SCHAİK, G., et al. Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: a case-control study. **Vet Q.** v. 23, n. 2, p. 71-6, 2001.
- VARADY, E.; TUBOLY, T.; DERBYSHIRE, J. B. Restriction endonuclease analysis of a porcine isolate of bovine herpesvirus type 1. **Can. J. Vet. Res.** v. 58, n. 1, p. 65-66, 1994.
- VILCEK, S., et al. Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Arch. Virol.** v. 146, n. 1, p. 99-115, 2001.
- VOGEL, F. S. F., et al. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Ciênc. Rur.**, v.31, n. 5, p.831-838, 2001.
- VOGES, H., et al. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immune-competent, non-viraemic bull. **Vet. Microb.**, v. 61, n. 3, p. 165-175, 1998.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine herpesvirus type 1: infection and diagnosis methods. **Semina: Ciênc. Agr.**, v. 22, n.2, p. 203-209, 2001.
- WANG, C. T. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 53, n. 3, p. 395-398, 1991.
- WOODBINE, K. A., et al. A four longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. **BMC Vet. Res.**, v.5, n. 5, p.5, 2009.

ZAGHAWA, A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, v. 45, n. 6, p. 345-351, 1998.