

Testes de ELISA e vírus-neutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no leite¹

Diego A.F. Sturza², Deniz Anziliero², Rudi Weiblen² e Eduardo Furtado Flores^{2*}

ABSTRACT.- Sturza D.A.F., Anziliero D., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. [ELISA and virus-neutralization in the detection of antibodies against bovine viral diarrhoea virus in Milk.] Testes de ELISA e vírus-neutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(11):985-990. Setor de Virologia, Prédio 20, sala 4200, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

The success of control/eradication programs of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection necessarily includes the identification and elimination of persistently infected (PI) animals. Since these animals continuously shed virus in secretions and excretions, the prevalence of antibodies in herds with PI animals is often high, and with high titers. Because of these characteristics, bulk milk samples were subjected to two serological techniques in order to establish the most appropriate in conducting screening of herds. For this, 767 bulk milk samples were analyzed by a indirect ELISA kit (reference test) and by an adapted virus neutralization (VNT) assay (proposed test). The toxic effects of milk on cell culture were reduced by increasing the final volume. One hundred seventy seven and 139 samples were positive in ELISA and VNT, respectively. Thus, the adapted VNT had a sensitivity of 76.8% and a specificity of 99.5%. The Kappa index (k) was 0.82, demonstrating an excellent agreement between the two techniques. The analysis of the coefficient of correlation between the absorbance values (OD) and VNT titers demonstrated a moderate positivity ($r = 0.57$). However, a significant part of samples with VNT titers ≥ 80 did not show high OD values. On the other hand, some samples with low VNT titers presented high ODs. VNT titers ≥ 80 are suggestive of the presence of PI animals in the herd. Therefore we conclude that the adapted VNT is more appropriate for herd screening when searching for herds with high antibody titers.

INDEX TERMS: Animals persistently infected, BVDV, diagnostic.

RESUMO.- O sucesso na estratégia de controle e erradicação do vírus da diarreia viral bovina (BVDV), passa necessariamente pela identificação e eliminação dos animais persistentemente infectados (PI). Como esses animais excretam continuamente o vírus em suas secreções e excreções, a prevalência de anticorpos no rebanho, frequentemente é alta e com altos títulos. Devido a essas características, amostras de tanques coletivos de leite, foram submetidas a duas técnicas sorológicas, a fim de estabele-

cer a mais adequada na realização de triagem de rebanhos. Para isso, 767 amostras coletivas de leite foram submetidas à análise por um kit ELISA indireto (teste referência) e pela técnica de vírus-neutralização (VNT) adaptada (teste proposto). Devido aos efeitos tóxicos do leite sobre o cultivo celular, a adaptação consistiu no aumento do volume final na etapa de incubação celular. Foram positivas, 177 e 139 amostras no ELISA e na VNT, respectivamente. Com isso, a VNT adaptada apresentou uma sensibilidade de 76,8% e uma especificidade de 99,5%. O índice Kappa (k) foi de 0,82, demonstrando uma ótima concordância entre as duas técnicas. A análise do coeficiente de correlação entre os valores de absorbância no ELISA (OD) e os títulos de anticorpos na VNT nas amostras positivas, demonstrou uma positividade moderada ($r = 0,57$) com $p < 0,05$. No entanto, várias amostras com títulos altos na VNT apresen-

¹ Recebido em 3 de agosto de 2011.

Aceito para publicação em 22 de agosto de 2011.

² Setor de Virologia, Prédio 20, sala 4200, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Cidade Universitária, Avenida Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: eduardofurtadoflores@gmail.com

taram ODs moderadas ou baixas. Por outro lado, algumas amostras com títulos neutralizantes baixos apresentaram ODs altas. Como a presença de animais PI é sugerida por títulos neutralizantes ≥ 80 , conclui-se que a técnica de VNT adaptada é mais adequada para a realização de triagem em amostras coletivas de leite quando objetiva-se detectar rebanhos com altos títulos de anticorpos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Animais persistentemente infectados, BVDV, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV) pertencente ao gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae*, é um dos principais patógenos de bovinos (Gunn et al. 2005). A infecção pelo BVDV durante a gestação, dependendo da idade do feto, pode resultar em reabsorção fetal, aborto, mumificação, malformação congênita, nascimento de bezerros normais, fracos ou persistentemente infectados (PI) (Kramps et al. 1999).

A fonte primária de disseminação do BVDV nos rebanhos são os animais PIs (Houe 1999, Niskanen, Lindberg & Trávén 2002). A exposição do feto ao BVDV antes do desenvolvimento completo do sistema imune (McClurkin et al. 1984), período aproximado entre 40 e 125 dias de gestação (Stokstad & Loken 2002), pode resultar no nascimento de animais imunotolerantes e que excretam continuamente grandes quantidades de vírus em excreções e secreções (Confer et al. 2005).

Animais virêmicos e imunotolerantes ao BVDV estão amplamente difundidos no rebanho bovino brasileiro (Oliveira et al. 1996, Botton et al. 1998, Flores et al. 2005). Oliveira (1996) realizou triagem em rebanhos com problemas reprodutivos no Rio Grande do Sul (RS) procurando identificar animais PIs, detectando 0,9% (12/1240) de amostras positivas (leucócitos, soro) para o vírus. Botton et al. (1998) examinaram amostras de soro de fetos coletados em matadouros, detectando anticorpos em 1,4% (19/1396) e vírus em 0,8% (11/1396). Em outro estudo, amostras de tanques coletivos de leite em rebanhos do estado do RS foram testadas pela técnica de vírus-neutralização (VNT) adaptada para a detecção de anticorpos no leite, detectando-se 8,8% (1.028/11.711) rebanhos com títulos neutralizantes >20 no leite; 1,5% (180/11.711) propriedades apresentaram o leite com títulos de anticorpos ≥ 80 , indicando infecção ativa e/ou à presença de animais PI (Brum et al. 2004). Segundo Baker (1995), embora aparentemente baixa, a prevalência de animais virêmicos é suficiente para manter o vírus na população. O que não exclui o potencial representado por outras espécies domésticas e selvagens. Juliá et al. (2009) demonstraram por sorologia a circulação do BVDV-1 e do BVDV-2 em ovinos. Em animais selvagens, estudos sorológicos demonstraram a presença de anticorpos anti-BVDV em uma ampla gama de espécies. O vírus também já foi isolado desses animais, o que levanta o questionamento sobre um possível intercâmbio entre os animais domésticos e os selvagens, devendo ser objeto de novas pesquisas no futuro (Vilcek & Nettleton 2006).

Os rebanhos que possuem animais PIs podem ser identificados por sorologia, já que a presença do vírus resulta

em níveis altos de anticorpos na maioria dos animais (Houe 1995). O diagnóstico de rebanho, cujo objetivo é detectar a presença ou ausência de uma determinada doença sem a necessidade de testar todos os animais individualmente, pode envolver várias estratégias. No caso do BVDV, podem-se destacar as seguintes em nível de rebanho: 1) detecção de anticorpos em tanques coletivos de leite; 2) detecção de anticorpos em soro individual ou de cinco animais jovens (9-18 meses); e 3) detecção em tanques coletivos de leite do vírus (Houe et al. 2006).

A mensuração de anticorpos em tanques coletivos de leite, visando estimar a exposição de um rebanho ao BVDV, é possível, uma vez que apresenta uma boa correlação com a prevalência de animais soropositivos no rebanho (Niskanen 1993). Também, pode-se inferir que em rebanhos com um alto nível de anticorpos nos tanques coletivos de leite, possivelmente há uma infecção ativa com o BVDV, sendo recomendado na sequência o teste de todos os animais para a detecção e eliminação de animais PI (Larsson et al. 1994, Bitsch & Ronsholt 1995).

Como método de escolha para triagem de rebanhos leiteiros, o teste ELISA indireto, tem sido o mais empregado na detecção de anticorpos anti-BVDV (Niskanen et al. 1991, Niskanen 1993, Paton et al. 1998, Lindberg & Alenius 1999). Nesses estudos, a diferenciação entre rebanhos possivelmente infectados e não-infectados usando amostras coletivas de leite, se baseia na estratificação dos valores de densidade óptica (OD) (Niskanen 1993, Beaudeau et al. 2001, Greiser-Wilke et al. 2003) amparados principalmente nos resultados de Niskanen (1993), Houe et al. (1995), Paton et al. (1998) os quais avaliando kits ELISA indireto, encontraram uma boa correlação entre altos valores de OD e prevalência de vacas soropositivas para BVDV.

Por outro lado, a técnica padrão para pesquisa de anticorpos anti-BVDV em soro é a vírus-neutralização (Edwards 1990). Contudo, por necessitar de condições laboratoriais mais exigentes que o teste ELISA, a VNT raramente foi empregada no diagnóstico de rebanho através do leite individual e/ou de tanques coletivos. Em laboratórios que dispõem de cultivo celular, com protocolo estabelecido para realização da VNT em amostras de soro, a possibilidade desse ser aplicado a amostras de leite, certamente reduziria custos e aproveitaria as condições laboratoriais já existentes.

Portanto, objetivou-se em um primeiro momento: adaptar a técnica de vírus-neutralização para a pesquisa de anticorpos anti-BVDV no leite de tanques coletivos, verificando as características de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e índice kappa em relação a um kit ELISA indireto, considerado neste caso a técnica padrão. Em um segundo momento, os títulos de anticorpos neutralizantes e os valores de densidade óptica (OD) foram correlacionados para estabelecer o grau de relação entre eles e dessa maneira estabelecer a técnica sorológica que determine com maior precisão aqueles rebanhos que serão submetidos à próxima etapa do programa de identificação e eliminação dos animais PI.

MATERIAL E MÉTODOS

Células e vírus. Os procedimentos de amplificação viral foram realizados em células de linhagem de rim bovino (MDBK - Madin Darby Bovine Kidney) livres de pestivirus. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina ($1,6 \text{ mgL}^{-1}$), estreptomicina ($0,4 \text{ mgL}^{-1}$) e nistatina ($0,02 \text{ mgL}^{-1}$), suplementado com 10% de soro equino. A cepa padrão de BVDV *Singer* foi utilizada nos testes de neutralização viral.

Amostras de leite. Foram testadas 767 amostras de leite coletivas, obtidas no Centro de Pesquisa em Alimentação da Universidade de Passo Fundo (CEPA/UPF) e enviadas ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (SV/UFSM). As alíquotas de leite foram enviadas resfriadas, com adição do conservante Bronopol (2-bromo-2nitropropane-1,3-diol). Para a realização dos testes sorológicos, as amostras foram previamente centrifugadas a 3.000 rpm por 30min a 4°C. A fase líquida situada abaixo da camada de gordura foi coletada para os testes e em seguida conservada a -20°C até o uso.

Teste comercial ELISA. A pesquisa de anticorpos anti-BVDV em 767 amostras de leite coletivo foi realizada por um kit ELISA indireto (HerdChek, Idexx, Maine, EUA). Os procedimentos foram conduzidos conforme as instruções do fabricante, testando-se as amostras de leite sem diluí-las. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram densidade óptica (OD) acima de 0,2.

Teste de citotoxicidade. Para se determinar as diluições tóxicas do leite para os cultivos celulares, foram realizados dois ensaios prévios. No primeiro simulou-se a VNT tradicional, no entanto, sem a adição do vírus. Após, decorrido o período de incubação de 96h a 37°C, os cultivos celulares foram observados sob microscopia óptica para visualização da morfologia celular e a integridade dos tapetes. Depois, conforme protocolo-padrão os tapetes celulares íntegros foram corados com cristal violeta. O segundo ensaio consistiu na realização da VNT tradicional, porém, após incubação da mistura leite-vírus por 2h a 37°C, foi adicionada uma suspensão de células MDBK em 50, 100, 200 e 250 μL de MEM suplementada com 10% de soro equino, seguindo-se de incubação em estufa de CO_2 a 37°C.

Teste de vírus-neutralização (VNT) adaptada. Após a realização da pesquisa de anticorpos anti-BVDV pelo kit ELISA e conhecimento dos resultados de citotoxicidade, procedeu-se a análise dos títulos de anticorpos pela VNT. Os testes foram realizados em placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando-se diluições crescentes na base 2 do leite (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320) frente à 100 DICC50 (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares/cavidade) da cepa de BVDV citopática *Singer*. Após incubação da mistura leite-vírus por 2h a 37°C, foi adicionada uma suspensão de células MDBK em 200 μL de MEM suplementada com 10% de soro equino, seguindo-se de incubação em estufa de CO_2 a 37°C. A leitura dos testes foi realizada após 96h de incubação, pelo monitoramento do efeito citopático (ECP).

Análise estatística. A sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da VNT adaptada foi calculada em relação ao teste ELISA indireto, e o grau de concordância entre os testes foi estimada pelo índice kappa (k). Após procedeu-se a correlação linear simples entre OD e títulos de anticorpos. Para tal, os valores de títulos de anticorpos (0, 5, 10, 20, 40, 80 e 160) foram substituídos respectivamente por (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Os valores de densidade óptica (OD) obtidos na leitura das amostras positivas pelo teste ELISA foram correlacionados pelo teste de Pearson (r), com os títulos de anticorpos anti-BVDV após o teste de VNT ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Teste de citotoxicidade

A realização dos testes de vírus-neutralização sem a adição de vírus, demonstrou que a citotoxicidade ao leite mantinha-se até a diluição de 1:40 - 1:80, como evidenciado por microscopia óptica e pelos tapetes celulares corados com cristal violeta. O segundo ensaio, no qual diferentes volumes de MEM foram adicionados a suspensão de células e soro equino, evidenciou que apenas algumas amostras na diluição 1:5 apresentaram toxicidade residual no volume de 200 μL , sendo este o valor considerado na realização dos testes (dados não mostrados).

Desempenho do teste de vírus neutralização e do ELISA no leite coletivo

A pesquisa de anticorpos anti-BVDV em amostras coletivas de leite pelo teste ELISA detectou 23,1% (177/767) positivas, com $\text{OD} \geq 0,2$. Já na VNT adaptada, 18,1% (139/767) foram positivas. Os resultados de ambos os testes estão apresentados no Quadro 1. Pode-se observar que os dois testes produziram resultados qualitativamente equivalentes (positivo ou negativo) em 723 amostras (94,3%). Com isso, a VNT apresentou sensibilidade de 76,8%; especificidade de 99,5%; valor preditivo positivo de 97,8%; valor preditivo negativo de 93,5% com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) em relação ao kit ELISA indireto (Quadro 1). O índice de concordância Kappa (k) entre os testes foi de 0,82, indicando uma ótima correlação entre as técnicas (Landis & Koch 1977). Na Figura 1, observa-se uma correlação moderada positiva ($r=0,57$) entre os dois testes (Plackett 1983), com uma confiabilidade de 95%.

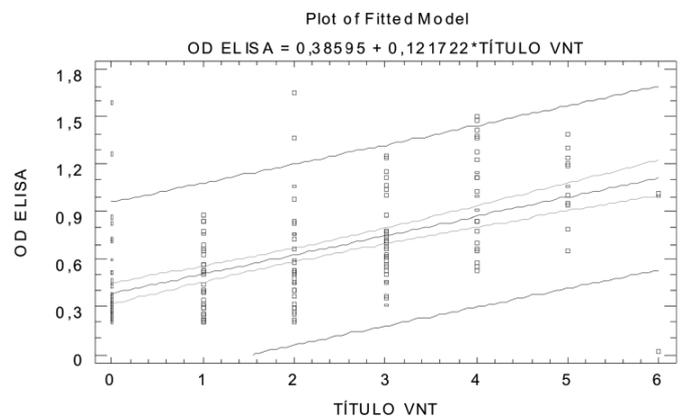


Fig.1. Correlação linear simples entre os valores de densidade óptica (OD) no ensaio imunoenzimático do tipo ELISA e os títulos de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no teste de vírus neutralização (VNT) adaptada a amostras de leite coletivo. Os valores no eixo x correspondem respectivamente aos títulos na VNT (0, 5, 10, 20, 40, 80 e 160).

DISCUSSÃO

Teste de citotoxicidade

Um dos objetivos do presente trabalho foi solucionar o problema da toxicidade do leite para os cultivos celulares utilizados no teste VNT. Essa citotoxicidade já fora relatada por Scherer et al. (2002). No presente trabalho,

foi simulada a VNT sem a adição de vírus, observando-se que a citotoxicidade ao leite mantinha-se até a diluição aproximada de 1:40 - 1:80. Scherer et al. (2002) conseguiram contornar o problema da citotoxicidade, realizando incubação da mistura leite-vírus com os cultivos celulares durante 20h, seguido da realização de imunofluorescência para detecção de antígenos virais nas células infectadas. Esse procedimento, porém, revelou-se extremamente laborioso, sendo de difícil aplicabilidade em larga escala. Ressalta-se, porém, que a VNT rápida descrita por Scherer et al. (2002) pode possuir importantes aplicações, sobretudo para amostras de soro tóxicas e quando é necessário o diagnóstico sorológico em curto espaço de tempo. A estratégia utilizada no presente trabalho foi a de aumentar o volume final do meio de cultivo (de 50µL para 200µL) durante a incubação celular. Utilizando-se essa estratégia, apenas algumas amostras na diluição 1:5 apresentaram toxicidade residual. Como o objetivo de uma triagem de rebanhos para identificar propriedades com atividade viral do BVDV é detectar apenas amostras com altos títulos (Brum et al. 2004), essa toxicidade residual não representa uma restrição para a técnica, pois manifesta-se apenas nas diluições baixas.

Desempenho da VNT e do ELISA no leite coletivo

Os resultados discrepantes observados no Quadro 1 - 5,3% (41/767) amostras negativas na VNT e positivas no ELISA - podem ser devidos à presença de anticorpos produzidos contra amostras virais antigenicamente diferentes da cepa *Singer* (BVDV-1) utilizada na VNT. De acordo com Deregt et al. (1998) o principal alvo dos anticorpos neutralizantes é a glicoproteína E2. A E2 é altamente antigênica e variável conforme os genótipos do BVDV. No BVDV-1, a E2 possui apenas um epítipo imunodominante, enquanto no BVDV-2, ela possui três epítipos imunodominantes. Com isso, a reatividade sorológica entre vírus dos genótipos BVDV-1 e BVDV-2 é geralmente muito baixa (Ridpath 2003). Como a maioria das amostras positivas no ELISA e negativas no VNT apresenta títulos baixos de anticorpos, não comprometeria o uso da VNT na triagem de rebanhos, pois rebanhos com animais PI geralmente possuem altos títulos.

Quadro 1. Resultados dos testes de ELISA e vírus neutralização (VN) adaptada para a detecção de anticorpos contra o BVDV em amostras de leite coletivo

Vírus neutralização	ELISA		Total (%)
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Positivos	136 ^a (17,7)	3 ^b (0,4)	139 ^{a+b} (18,1)
Negativos	41 ^c (5,3)	587 ^d (76,5)	590 ^{c+d} (76,9)
Total	177 ^{a+c} (23,1)	590 ^{b+d} (76,9)	767 ^{a+b+c+d} (100)

Sensibilidade relativa: (a) / (a+c) x 100=136/177x100=76,8%.

Especificidade relativa: (d) / (b+d) x 100=587/590x100=99,5%.

Valor preditivo positivo: (a) / (a+b) x 100=136/139x100=97,8%.

Valor preditivo negativo: (d) / (c+d) x 100=587/590x100=99,5%.

Kappa = Precisão observada (PO) - precisão esperada (PE)/1 - PE=0,271/0,329=0,82.

Em relação a 0,4% (3/767) amostras positivas na VNT, com título baixo (1:10) mas negativas no ELISA - por representar uma pequena parcela das amostras, aliado ao baixo título, esses valores discordantes possivelmente refletem diferenças de sensibilidade entre as técnicas.

O segundo aspecto verificado no presente trabalho vai ao encontro do que foi exposto por Sandvik (1999), o qual afirma que para a identificação de animais PI em um rebanho é essencial o conhecimento detalhado do desempenho dos testes diagnósticos, bem como as características epidemiológicas da infecção pelo BVDV. Para sustentar tal idéia, os resultados de ambos os testes (títulos anti-BVDV e OD) utilizados usualmente para a triagem de rebanhos, foram confrontados, e os resultados podem ser observados no Quadro 2. Alguns pontos merecem atenção, sendo eles: (1) o menor valor de OD ($\geq 0,2$) e o maior (1,65) ocorreram em amostras que possuíam títulos de 10 na VNT; (2) apesar de haver uma tendência de diminuição da amplitude total a partir das amostras compreendidas nos títulos ≥ 80 , essas não apresentam os maiores valores de OD; e (3) títulos considerados baixos para uma possível pesquisa de animais PI, ou seja, inferiores a 80 foram encontrados em 92,1% (163/177) amostras no ELISA. Esses resultados demonstram que o teste ELISA quando empregado com o objetivo de detectar altos títulos de anticorpos em amostras coletivas de leite, não é a técnica sorológica mais adequada, uma vez que em apenas 7,9% (14/177) amostras possivelmente haverá uma infecção ativa e/ou presença de animais PI no rebanho.

Quadro 2. Distribuição dos títulos de anticorpos no teste de vírus neutralização (VNT) adaptada e a respectiva densidade óptica (OD), das amostras coletivas de leite que foram positivas (OD $\geq 0,2$) no ensaio imunoenzimático do tipo ELISA

VNT título	ELISA (OD)			Número de amostras
	Intervalo	Mediana	Amplitude total	
<5	0,2 - 1,59	0,32	1,39	41
5	0,2 - 0,88	0,41	0,68	33
10	0,2 - 1,65	0,52	1,45	31
20	0,31 - 1,26	0,67	0,95	36
40	0,53 - 1,50	1,02	0,97	22
80	0,65 - 1,40	1,06	0,75	11
160	1,00 - 1,08	1,02	0,08	3

Para evidenciar a sequência prática de um resultado positivo na triagem de rebanhos, cujo objetivo é identificar e eliminar os animais PI, os trabalhos de Sandvik (1999) e Houe, Lindberg & Moening (2006) demonstram que é necessário proceder à coleta de sangue de todos os animais da propriedade com idade superior a três meses, e o seu teste pela técnica de isolamento viral (Edwards 1990). Caso um animal seja positivo nesse teste, para ser excluída a probabilidade de uma infecção aguda é necessário entre 3-4 semanas um reteste. Do ponto de vista epidemiológico e econômico, deve-se considerar ainda:

(1) a maioria das infecções causadas pelo BVDV são sub-clínicas, e por isso, de difícil diagnóstico e mensuração das perdas econômicas (Houe 1999); (2) os animais PI em uma população endêmica alcançam um nível máximo de 2% (Houe 1999); (3) apesar do conhecimento sobre a doença estar crescendo no Brasil e no mundo, a importância da enfermidade para os produtores é restrita aos mais tecnificados e/ou para aqueles que usufruem de um programa de extensão (Flores et al. 2005); e (4) não há um programa oficial de controle e erradicação do BVDV no Brasil (Flores et al. 2005).

Por esses motivos, o programa de controle e erradicação do BVDV, cuja característica é a adesão voluntária dos produtores, como é observado em todos os países que implantaram essa medida (Houe et al. 2006), deve ser capaz de aliar com precisão o desempenho dos testes de diagnóstico com as condições epidemiológicas e econômicas para a sua viabilidade. Para tal, o sucesso dependerá da capacidade de identificação daquelas propriedades com infecção viral ativa e/ou presença de animais PI, o que somente é possível com o emprego de testes sorológicos capazes de detectar altos títulos de anticorpos anti-BVDV.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstram que foi possível solucionar o problema da toxicidade do leite para as células na VNT, aumentando-se o volume final da suspensão celular durante o período de incubação.

Também, pode-se inferir que não existe correlação linear perfeita entre a absorbância (OD) no ELISA e os títulos de anticorpos anti-BVDV na VNT, o que impede a utilização do ELISA para a detecção exclusiva de rebanhos com altos títulos de anticorpos.

Por isso, o teste VNT é o mais recomendado para triagens de rebanhos, quando objetiva-se detectar rebanhos com títulos de anticorpos que indiquem provável circulação viral.

REFERÊNCIAS

- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. North Am.* 11:425-446.
- Beaudeau F., Belloc C., Seegers H., Assié S., Sella E. & Joly A. 2001. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Vet. Microbiol.* 80:329-337.
- Bitsch V. & Ronsholt L. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus without application of vaccines. *Vet. Clin. North Am.* 11:627-640.
- Botton S.A., Silva A.M., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 1998. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:1429-1438.
- Brum L.P., Flores E.F., Weiblen R., Scherer C.F.C., Kreutz L.C., Lima M., Mazzutti K.C., Pan K.A., Quadros V.L. & Walter J. 2004. Detecção de anticorpos contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em amostras de tanques de leite de rebanhos do Rio Grande do Sul. *Revta. Bras. Cienc. Vet.* 11:84-87.
- Confer A.W., Fulton R.W., Step D.L., Johnson B.J. & Ridpath J.F. 2005. Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Vet. Pathol.* 42:192-199.
- Deregt D., Van R.P.A., Wiens T.Y. & Van D.H.J. 1998. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Res.* 57:171-181.
- Donis R.O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am.* 11(3): 393-423.
- Edwards S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9:115-130.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehe P.M., Alfieri A.A. & Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25:125-134.
- Gunn G.J., Saatkamp H.W., Humphry R.W. & Stott A.W. 2005. Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. *Prev. Vet. Med.* 72:149-162.
- Greiser-Wilke I., Grummer B. & Moennig V. 2003. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biology* 31:113-118.
- Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am.* 11:521-548.
- Houe H., Baker J.C., Maes R.K., Ruegg P.L. & Lloyd J.W. 1995. Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:327-332.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64:89-107.
- Houe H., Lindberg A. & Moennig V. 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:427-436.
- Juliá S., Craig M.I., Jiménez L.S., Pinto G.B. & Weber E.L. 2009. First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 90:274-277.
- Kramps J.A., Maanen C.V., Wetering G.V., Stienstra G., Quak S., Brinkhof J., Rünsholt L. & Nylin B. 1999. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet. Microbiol.* 64:135-144.
- Landis J.R. & Koch G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174
- Larsson B., Niskanen R. & Alenius S. 1994. Natural infection with bovine virus diarrhoea virus in a dairy herd: A spectrum of symptoms including early reproductive failure and retained placenta. *Ani. Rep. Sci.* 36:37-48.
- Lindberg A. & Alenius S. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* 64:197-222.
- McClurkin A.W., Littledike E.T., Cutlip R.C., Frank G.H., Coria M.F. & Bolin S.R. 1984. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. *Can. J. Comp. Med.* 48:156-161.
- Niskanen R., Alenius S., Larsson B. & Jacobsson S.O. 1991. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch. Virol.* 3:245-251.
- Niskanen R. 1993. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.* 133:341-344.
- Niskanen R., Lindberg A. & Tråvén M. 2002. Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. *Vet. Journal* 163:251-259.
- Oliveira E.A.S. 1996. Caracterização antigênica de amostras de vírus da diarreia vírica bovina com anticorpos monoclonais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 65p.
- Oliveira L.G., Roehe P.M., Oliveira E.A.S., Silva L.H.T., Vieira L.A., Silva T.C. & Caldas A.P.F. 1996. Presença de pestivirus e anticorpos contra pestivirus em soros e cultivos celulares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48:513-23.
- Paton D.J., Christiansen K.H., Alenius S., Cranwell M.P., Pritchard G.C. & Drew T.W. 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.* 142:385-391.

- Plackett R.L. 1983. Karl Pearson and the Chi-squared Test. *Int. Stat. Rev.* 51:59-72.
- Ridpath J.F. 2003. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biology* 31:127-131.
- Sandvik T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 64:123-134.
- Scherer C.F.C., Flores E.F., Weiblen R., Kreutz L.C., Dürr J.W., Brum L.P., Quadros V.L. & Lima M. 2002. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no leite. *Pesq. Vet. Bras.* 22:45-50.
- Stokstad M. & Loken T. 2002. Pestivirus in cattle: experimentally induced persistent infection in calves. *J. Vet. Med. B* 19:494-501.
- Vilcek S. & Nettleton P.F. 2006. Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol.* 116:1-12.