

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária



PESQUISA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O VÍRUS DA DIARRÉIA
BOVINA - DOENÇA DAS MUCOSAS EM MINAS GERAIS

Teresinha Romano Vieira

Belo Horizonte
Minas Gerais
1989

T636.089 59
V658 p
1989

Teresinha Romano Vieira



PESQUISA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O VÍRUS DA DIARRÉIA
BOVINA - DOENÇA DAS MUCOSAS EM MINAS GERAIS

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

OK
02/103/04/00

Belo Horizonte
Minas Gerais
1989

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
20/03/90
50390-08

20/03/90
6018-10800

636.208.969 2

V658p Vieira, Teresinha Romano, 1958-

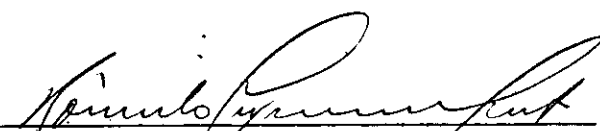
Pesquisa de anticorpos neutralizantes para o vírus da mucosas em Minas Gerais./Teresinha Romano Vieira. - Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1989.

29p.: il.-

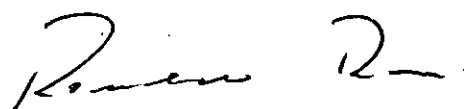
Tese Mestre em Medicina Veterinária Preventiva.

1. Doença das mucosas em bovinos - Diagnóstico - Minas Gerais. I. Título.

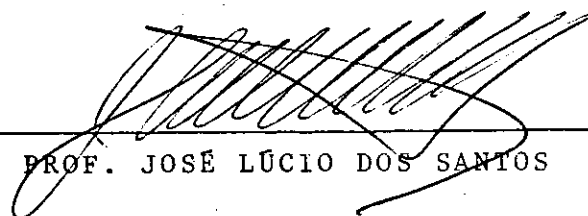
Aprovada em: 24/2/89



PROF. RÔMULO CERQUEIRA LEITE
- Orientador -



PROF. RONALDO REIS



PROF. JOSÉ LÚCIO DOS SANTOS



PROF. ISRAEL JOSÉ DA SILVA

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos amigos pelo apoio, solidariedade e incentivo nos momentos difíceis.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela orientação e incentivo.

Aos colegas Jurandir Manso da Rocha e Aires Manoel de Souza pelo agradável convívio.

A aqueles que criando obstáculos me proporcionaram e estimularam a enfrentar constantes desafios.

A todos os funcionários, professores e colegas que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.



RESUMO

Com o objetivo de determinar a frequência de anticorpos neutralizantes para BVD em bovinos no Estado de Minas Gerais, foram analisadas 264 amostras de soro, proveniente de matadouros e rebanhos com e sem histórico de problemas reprodutivos, através do teste de soroneutralização em placa (microtécnica), utilizando como vírus a amostra Oregon C₂₄V. Foram encontradas 199 amostras com títulos variando de 1:8 a 1:512 (75,38%). Dos 77 soros provenientes de rebanhos com histórico de problemas reprodutivos com resultados negativos para brucelose, leptospirose e IBR, 63 (81,82%) apresentaram títulos que variaram de 1:8 a 1:512.

Os resultados obtidos sugerem uma elevada disseminação da infecção entre os rebanhos bovinos do Estado de Minas Gerais.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. ESTUDO EVOLUTIVO DA DIARRÉIA BOVINA A VÍRUS.....	03
2.1. Aspectos gerais da doença.....	03
2.2. Importância da BVD.....	05
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
3.1. Técnicas de diagnóstico laboratorial.....	07
3.2. Prevalência da BVD.....	09
3.3. Estudos da BVD-DM no Brasil.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Pré-experimento.....	13
4.2. Determinação da amostra.....	13
4.3. Delineamento experimental.....	15
4.3.1. Vírus de referência.....	15
4.3.2. Cultivos celulares.....	18
4.3.3. Técnica utilizada.....	18
5. RESULTADOS.....	20
6. DISCUSSÃO.....	21

Página

7. CONCLUSÕES.....	23
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24



LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Títulos neutralizantes para BVD-DM observados em 100 amostras de hemossoros bovinos, colhidas em frigoríficos na região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, 1988....	14
TABELA II - Títulos neutralizantes para BVD-DM observados em 264 amostras sorológicas de bovinos provenientes de municípios de Minas Gerais, 1988.....	16
TABELA III - Títulos sorológicos para BVD-DM observados em rebanhos bovinos com histórico de problemas reprodutivos no Estado de Minas Gerais, 1988.....	17



1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina das Américas assume grande importância na economia, não só por constituir fonte de alimentos para a população, mas também por representar, através da exportação de carne e subprodutos, uma das principais fontes de divisas para muitos países. No entanto, existem fatores que limitam a produção de alimentos de origem animal. A ocorrência de enfermidade constitui um dos principais obstáculos para o aumento da produção bovina, principalmente quando se utilizam raças especializadas que possuem bom padrão genético (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1986).

Dentre as várias doenças bovinas, a Diarréia Bovina a Vírus, desde seu aparecimento em 1946 nos EUA, vem alcançando importante posição pela sua interferência no desenvolvimento pecuário. Assim HEUSCHELE (1978) sugeriu que o vírus da BVD pode ser a principal causa de perda econômica na pecuária leiteira nos EUA. DUFFEL et alii (1986) relacionaram que as perdas econômicas pela BVD resultam de aborto, natimorto, infertilidade e progênie persistentemente infectada. MOSSAMN & HANLY (1976) ao estudarem a difusão da BVD na Costa Leste (EUA), calcularam que as perdas econômicas chegaram a US\$50,000.00 dólares em um rebanho.

No Brasil, tem sido relatada a presença do vírus no Rio Grande do Sul, São Paulo e Bahia. Apesar da presença de e-

vidências da doença em Minas Gerais, até hoje não houve nenhuma pesquisa sobre o assunto.

Assim, é propósito desta tese fazer um estudo da presença de anticorpos anti-BVD em soros sanguíneos de bovinos do Estado de Minas Gerais, pelo método de soroneutralização.



2. ESTUDO EVOLUTIVO DA DIARRÉIA BOVINA A VÍRUS

2.1. Aspectos gerais da doença

Em 1945, uma enfermidade bovina caracterizada por ulcerações no aparelho digestivo e diarréia com morbidade alta ($\pm 90\%$) e mortalidade baixa ($\pm 10\%$) foi descrita no Estado de New York (EUA) por OLAFSON et alii (1946). Posteriormente, esta enfermidade foi denominada diarréia bovina a vírus (BVD) e o agente etiológico foi isolado em cultura de células BK em 1957.

Em 1953, enfermidade similar foi descrita em bovinos no Estado de Iowa, atingindo em torno de 10% dos animais. Porém, os sinais clínicos e achados patológicos eram mais severos do que os encontrados em 1946. A maioria ($\pm 100\%$) dos animais acometidos morria por gastroenterite hemorrágica sendo a esta enfermidade denominada doenças das mucosas (DM) (BUXTON & FRASER, 1977).

Grande número de amostras de vírus isoladas de ambas enfermidades, em várias partes do mundo, foram examinadas imunológica e sorologicamente durante dois anos. Demonstrou-se que eram antigenicamente semelhantes, embora produzissem manifestações clínicas e patológicas diversas (GILLESPIE et alii, 1961; BUXTON & FRASER, 1977).

O agente etiológico da BVD é um RNA vírus da fami-

Togaviridae, gênero *Pestivirus*. As partículas víricas maduras são sensíveis ao éter, clorofórmio, desinfetantes (clorexidine, lysol, iodo, aldeídos, hipocloritos), pH baixo (< 3) e não são estáveis a 50°C com MgCl₂. O vírus é rapidamente inativado a 56°C por 30 minutos. A maioria das amostras são estáveis a baixa temperatura e permanecem viáveis por anos quando liofilizadas ou estocadas a -70°C, produzindo títulos entre 10⁵⁰⁻⁶⁵TCID₅₀/ml em células esqueléticas ou musculares de embriões bovinos e ovinos, células renais bovinas e suínas e células intestinais humanas -Henle, células humanas -Hela (LEE & GILLESPIE, 1957; FERNELIUS et alii, 1969; BUXTON & FRASER, 1977; AMES, 1986).

O vírus BVD é antigenicamente semelhante ao vírus da peste suína ("hog cholera") e ao vírus "Border disease" de ovinos, também do gênero *Pestivirus* (AMES, 1986; BACKER, 1987). Além da variação antigênica, pode induzir ou não efeito citopático (ECP) em cultura celular. A amostra não citopática (NCP) não produz alterações celulares e pode ser evidenciada por imunofluorescência direta. As amostras citopáticas (CP) produzem visível efeito citopático (ECP), dois a cinco dias após inoculação. Porém, efeitos mais pronunciados ocorrem entre seis a oito dias. O ECP é caracterizado por arredondamento precoce e granulação celular, alongamento e diminuição das células afetadas, morte e desprendimento celular (GILLESPIE et alii, 1960; COGGINS, 1964; MARCUS & MOLL, 1968; BUXTON & FRASER, 1977; BACKER, 1987). Ambas as amostras (CP e NCP) são patogênicas para bovinos (BACKER, 1987).

Diarréia bovina a vírus é enfermidade cosmopolita caracterizada por sinais clínicos e alterações patológicas brandas, como pirexia de curta duração, perda temporária na produção de leite em vacas lactantes, ligeiro aumento de linfonodos, diarréia por poucos dias, ulcerações na boca, lesões erosivas no aparelho digestivo, imunossupressão, problemas reprodutivos (repetição de cio, aborto, infertilidade, natimortos, fetos mumificados). Quando na forma de doença das mucosas, caracteriza-se por pirexia (40,5 - 41°C), depressão, anorexia, fraqueza, au

mento das taxas respiratória e cardíaca, emaciação, desidratação e diminuição da produção de leite. Severa leucopenia, neutropenia com desvio para esquerda e trombocitopenia podem ocorrer (HUCK, 1962; VIDOR, 1974; BUXTON & FRASER, 1977; TARABLA et alii, 1980; MOHANTY & DUTTA, 1981; MAHIN et alii, 1982; OHMANN, 1983; GRAHN et alii, 1984; AMES, 1986; DUFFEL et alii, 1986; HOWARD et alii, 1986; BACKER, 1987; SHARPE et alii, 1987).

2.2. Importância da BVD

Diarréia bovina a vírus constitui uma enfermidade que possui formas variadas de manifestação. Na grande maioria (70 - 90%) dos bovinos adultos susceptíveis ao vírus BVD, sua manifestação faz-se subclínicamente (WIZIGMANN et alii, 1972; NETTLETON et alii, 1985; AMES, 1986; HOWARD et alii, 1986; BACKER, 1987; HOWARD et alii, 1987).

Apesar de ser mais comum a infecção subclínica, outras formas de manifestações também ocorrem. Existem manifestações da enfermidade propriamente dita, BVD associada a enfermidade respiratória, BVD infectando fetos e causando doença das mucosas.

A manifestação da diarréia bovina a vírus propriamente dita refere-se a infecção aguda em bovinos soronegativos e imunocompetentes (BACKER, 1987). Geralmente ocorre em bovinos cuja faixa etária varia de seis a 24 meses de idade. Os sinais clínicos mais comuns incluem redução na produção de leite, inapetência, descarga óculo-nasal, lesões orais, laminite (NETTLETON et alii, 1985; AMES, 1986; HOWARD et alii, 1986; BACKER, 1987; HOWARD et alii, 1987).

Sêmen de bovinos persistentemente infectados com vírus BVD pode infectar vacas susceptíveis. O vírus induz diminuição na motilidade do espermatozóide, e modificação na morfologia das células espermáticas. Vírus BVD pode causar repetição de cio se a infecção for por monta natural em animais soronegativos, aumentando, assim, o número de serviço/concepção (BACKER,

1987).

Infecção em vacas prenhas pode produzir abortos, natimortos, fetos mumificados, crias com anomalias congênitas ou normais. GRAHN et alii (1984) observaram alta taxa de infertilidade em vacas inoculadas com vírus BVD-DM e verificaram que o vírus interfere no mecanismo de fertilização. ARCHBALD & ZEMJANIS (1977) concluíram que pode ocorrer infecção latente na trompa uterina, e conseqüentemente contágio do embrião. DUFFELL et alii (1986) e HOWARD et alii (1986) observaram que, dependendo do estágio da gestação, infecção por vírus BVD-DM pode induzir resposta imunológica no feto, produzindo malformações (hipoplasia cerebelar, ataxia, cegueira, opacidade corneal, retinite, defeitos de mielinização da corda espinhal), morte ou resultando no nascimento de bazerros com viremia persistente.

Vírus do gênero *Pestivirus* tem a propriedade de produzir infecções persistentes em fetos, produzindo animais permanentemente infectados ou imunotolerantes. Os animais permanentemente infectados constituem fonte importante na disseminação do vírus BVD. Animais imunotolerantes são responsáveis pela difusão do vírus no rebanho. Imunotolerância e infecção persistente parecem estar associadas à infecção com vírus BVD não citopatogênico (NETTLETON et alii, 1985; AMES, 1986; BACKER, 1987). BACKER (1987) afirma que bovinos imunotolerantes ao vírus BVD estão permanentemente infectados e virêmicos, podendo ter ou não baixas concentrações de anticorpos neutralizantes específicos e, conseqüentemente, aparentarem-se sadios. Os animais persistentemente infectados são imunotolerantes ao vírus BVD e incompetentes a outros antígenos como vírus IBR, PI-3.

O vírus BVD produz imunossupressão, podendo potencializar ou favorecer a patogenicidade de outros agentes (vírus PI-3, IBR, coronavírus, rotavírus, *Pasteurella* spp, *Salmonella* spp, coccídios). Devido à imunossupressão, várias manifestações podem ocorrer no animal, principalmente vinculadas ao trato respiratório (WIZIGMANN et alii, 1973; MOSSAMAN & HANLY, 1976; AMES, 1986; RUTH, 1986; BACKER, 1987; HOWARD et alii, 1987).



3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Técnicas de diagnóstico laboratorial

Após o aparecimento da enfermidade BVD-DM em 1946, pesquisadores iniciaram estudos sobre métodos adequados para diagnóstico desta enfermidade. Vários foram os métodos utilizados e entre eles os mais estudados e comparados foram soroneutralização, imunofluorescência, ELISA, técnica de imunoperoxidase, sendo a soroneutralização teste de escolha para este trabalho.

ROBSON et alii (1960) empregaram, pela primeira vez, o teste de soroneutralização para diagnóstico da BVD. Utilizaram 59 bovinos livres da doença para o teste. Trabalharam com amostras pareadas. A primeira foi colhida antes da primeira inoculação e a segunda entre 14-28 dias após. Todos os 59 bovinos desenvolveram sintomas típicos de diarreia a vírus, caracterizados por aumento bifásico da temperatura e leucopenia. Duas a quatro semanas após a primeira inoculação todos os bovinos foram desafiados e eram sorologicamente positivos no momento da segunda inoculação, porém permanecendo livres de qualquer sintoma. Os títulos de soros na segunda colheita, duas semanas após a inoculação, variaram de 1:8 a 1:280 e aqueles colhidos quatro semanas após, variaram de 1:210 a 1:2450. Os autores concluíram que a acuidade do teste era adequada e que este substi

tuiu com vantagens o método de desafio direto na avaliação da imunidade do animal. O teste de soroneutralização pode ser utilizado para avaliar a imunidade do animal, apresentando 95% de acuidade.

COGGINS (1964) utilizou a amostra oregon C₂₄V para a padronização da testes de neutralização em tubos para diarréia bovina a vírus. Verificou que neste tipo de teste, a titulação do vírus é ligeiramente menos sensível.

O isolamento de vírus e o aumento de anticorpos em animais convalescentes tem sido fatores essenciais para um diagnóstico preciso. Mas para isso, é preciso de técnicas padronizadas. O Comitê para recomendação de Técnicas Padrões para Diagnóstico de Doenças Respiratórias Bovinas, composto pelo Dr. CARBREY et alii (1971) propôs a padronização da técnica de soroneutralização para BVD e IBR, juntamente com a técnica da hemaglutinação e teste da inibição para anticorpos séricos contra o vírus da Parainfluenza-3. Concluíram que anticorpos neutralizantes no soro sanguíneo de bovinos é prova conclusiva de que o animal foi infectado previamente ou tem imunidade passiva através do colostro. Contudo informação confiável só pode ser baseada em sorologia pareada. Um título baixo como 1:2, pode ser início ou término de infecção.

DANNACHER & MARTEL (1978) pesquisaram títulos de anticorpos contra vírus BVD usando microtécnica de soroneutralização e compararam o resultado obtido com o método de soroneutralização em tubo. Concluíram que a microtécnica de soroneutralização é mais sensível que o método em tubo, com títulos séricos superiores a 0,5 log decimal. A precisão dos resultados demonstrou-se satisfatória.

HARKNESS et alii (1978) compararam resultados obtidos pelo teste de soroneutralização com fixação de complemento e imunodifusão. Um total de 1593 soros foram examinados através do teste de soroneutralização e 991 foram positivos (62,2%) com títulos \geq 1:10. De um total de 1596 soros, 843 (52,8%) foram reagentes pela imunodifusão e 4% apresentaram reação duvi-

dosa. Pelo teste de fixação de complemento, 33,7% dos soros tinham título $\geq 1:4$ e 17,8% (284 de 1596) soros foram positivos na diluição $\geq 1:8$. A maioria dos soros (86%) negativos pelo teste de imunodifusão (ID) também o foram pela soroneutralização (SN) e 91,5% dos soros foram negativos pela fixação de complemento (FC). De 54 soros com resultados duvidosos pela ID, 60 (93,8%) foram positivos pela SN e apenas 15 (23,4%) foram positivos pela FC. Apenas sete soros positivos pela ID (0,8%) foram negativos pela SN, mas 46,4% de soros positivos pela ID eram negativos pela FC. Comparando os resultados obtidos de 142 soros pareados testados pelos três métodos, os autores encontraram que 108 foram positivos pelo teste de SN, 66 pela FC e 65 pela ID. Em apenas quatro ocasiões, resultados positivos foram evidenciados pela FC e ID e não o foram pela SN, enquanto que 22 soros foram positivos apenas pelo teste de SN. Segundo os autores, os resultados obtidos indicam claramente que o teste de SN é superior aos outros dois testes.

JUSTEWICZ et alii (1987) compararam o método de soroneutralização para o vírus da BVD em 60 soros de bovinos com o teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e encontraram 92% de concordância. Concluíram que os dois testes são confiáveis para o diagnóstico sorológico da BVD.

3.2. Prevalência da BVD

A prevalência de anticorpos contra o vírus da BVD foi estudada em vários países, por diversos autores, utilizando o método de soroneutralização associado ou não a outras provas sorológicas.

HAFEZ et alii (1976), analisando 62 soros de bovinos nos EUA, pelo teste de soroneutralização, encontraram 48% (30 de 62) soros positivos para BVD.

OKEKE (1976) investigou a incidência do complexo BVD-DM nos estados do norte da Nigéria. De um total de 291 amostras de soros testadas pela soroneutralização, 13,4% (39 soros) con-

tinham anticorpos neutralizantes contra vírus BVD (amostra Oregon C₂₄V). Segundo o autor os resultados obtidos indicam presença de BVD na Nigéria, considerando que não existe vacinação para BVD nas regiões onde as amostras de soros foram colhidas.

PABLO CORREA et alii (1976), estudando problemas reprodutivos em bovinos do D.F. no Estado do México, procuraram relacionar as várias doenças que poderiam estar envolvidas no processo. Dentre estas, a BVD foi constatada, através do teste de soroneutralização em placa, 75% de 47 bovinos com problemas reprodutivos.

SINGH et alii (1977) encontraram pela técnica de soroneutralização que 32% (117 de 372) no Líbano; 37% (41 de 69) no Afeganistão; 64% (43 de 67) no Iraque; 61% (42 de 69) na Jordânia e 44% (36 de 79 amostras de soros sanguíneos de bovinos) na Síria, foram positivos para BVD-DM.

HARKNESS et alii (1978), em inquérito epidemiológico na população bovina da Inglaterra e País de Gales, encontraram 62% (991 de 1593 soros) de animais com títulos neutralizantes para vírus BVD-DM amostra NADL.

RICE & JENNEY (1979) pesquisaram a presença de anticorpos para IBR, BVD e PI-3 em 393 soros de bovinos com idade entre dois a seis meses, provenientes de 14 rebanhos com histórico de problemas respiratórios em El Salvador. Encontraram 36,8% (145), 43,5% (171) e 96,7% (377) soros positivos para IBR, BVD e PI-3 respectivamente. Pela presença de anticorpos e a não utilização de vacina contra BVD, concluiu-se pela presença da infecção nos rebanhos salvadorenses.

O estudo de prevalência sorológica para sete tipos de vírus diferentes foi feito em 19 Estados do México por SUZAN et alii (1983). Entre esses vírus, estava o da BVD que pelo teste da soroneutralização e considerando como positivo aqueles que davam títulos $\geq 1:5$, foi encontrado 70,5% (93 de 132) com esta titulação. Disto, pode-se deduzir que o vírus BVD está presente no rebanho mexicano, porém estudos mais precisos, como o isolamento do vírus de casos clínicos será necessário para es-

clarecer a importância do mesmo.

HOWARD et alii (1986) pesquisaram presença de anticorpos contra BVD no Reino Unido. Utilizaram um total de 924 animais, onde 666 eram bezerros entre dois a quatro meses de idade, 93 eram vacas prenhas aparentemente saudáveis e 165 eram bezerros gnotobióticos. Encontraram 0,8% (sete de 924 soros) animais positivos, sendo que dois dos bezerros gnotobióticos tinham o vírus BVD.

EDWARDS et alii (1987), pesquisando anticorpos contra vírus BVD-DM em 18759 soros, encontraram 64,9% (12179) soros positivos na Inglaterra e País de Gales.

3.3. Estudos da BVD-DM no Brasil

CORREA et alii (1968) observaram clinicamente, em 1966-1967, quatro focos de BVD-DM no Estado de São Paulo.

WIZIGMANN et alii (1972) verificaram ocorrência de BVD-DM no Estado do Rio Grande do Sul. Soros de 229 bovinos adultos de 11 municípios foram testados quanto à presença de anticorpos contra o vírus PI-3, IBR, BVD-DM. Constataram anticorpos contra vírus PI-3 em 97%, anticorpos contra vírus IBR em 33% e anticorpos contra vírus BVD-DM em 39% dos soros examinados. Foram encontrados títulos de anticorpos contra vírus BVD-DM entre 1:8 e \leq 1:256.

SOARES & PEREIRA (1974) pesquisaram anticorpos neutralizantes contra vírus BVD-DM (amostra Oregon C₂₄V) em 31 amostras sorológicas de animais convalescentes, 59 amostras sorológicas de animais adultos clinicamente saudáveis e dez misturas de soros de bezerros no Estado de São Paulo. A sorologia evidenciou anticorpos neutralizantes em 38,7% dos animais doentes (títulos 1:25 a 1:625) e 3,4% dos animais saudáveis (títulos 1:5 a 1:25). Dos dez "pools" de soros de bezerros, três continham anticorpos.

VIDOR (1974) isolou e identificou vírus BVD-DM a partir de soros de bovinos provenientes de matadouros, doadores de

soro, órgãos para cultivos primários, provenientes do município de Gravataí, Rio Grande do Sul. Concluiu que infecções inaparentes pelo vírus BVD-DM podem ocorrer e que a falta de diagnóstico clínico da enfermidade indica ocorrência de infecção subclínica, ou falta de reconhecimento dos sintomas. Postula também a necessidade de realização de diagnóstico diferencial com outras doenças.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Prê-experimento

Tendo em vista a literatura consultada e ainda a carência de informações específicas sobre a doença no Estado de Minas Gerais, realizou-se um prê-experimento para determinação de amostra e montagem das técnicas de diagn^ostico. No prê-experimento analisaram-se 100 amostras de soros de bovinos adultos colhidos aleatoriamente em matadouro, e através do teste de soroneutralização em placa (microtécnica) (TAB. I).

4.2. Determinação da amostra

Em função dos resultados obtidos no prê-experimento, o número de hemossoros trabalhados foi determinado, segundo as recomendações do CENTRO PANAMERICANO DE ZONÓSES (1979), aplicando-se a seguinte fórmula:

$$n = \frac{p (100-p) Z^2}{\frac{pd}{100}^2}$$

onde:

n = número de amostras a serem trabalhadas.

TABELA I - Títulos neutralizantes para BVD-DM observados em 100 amostras de hemossoros bovinos, colhidas em frigoríficos na região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, 1988

Soros testados	T í t u l o s e n c o n t r a d o s											
	1:4 (%)	1:8 (%)	1:16 (%)	1:32 (%)	1:64 (%)	1:128 (%)	1:256 (%)	1:512 (%)				
1 —	10	-	-	03 (30,00)	05 (50,00)	-	-	-	02 (20,00)	-	-	-
10 —	20	04 (40,00)	01 (10,00)	01 (10,00)	01 (10,00)	02 (20,00)	01 (10,00)	-	-	-	-	-
20 —	30	06 (60,00)	-	02 (20,00)	01 (10,00)	01 (10,00)	-	-	-	-	-	-
30 —	40	06 (60,00)	-	03 (30,00)	01 (10,00)	-	-	-	-	-	-	-
40 —	50	01 (10,00)	04 (40,00)	03 (30,00)	01 (10,00)	01 (10,00)	-	-	-	-	-	-
50 —	60	-	06 (60,00)	01 (10,00)	03 (30,00)	-	-	-	-	-	-	-
60 —	70	04 (40,00)	01 (10,00)	02 (20,00)	01 (10,00)	01 (10,00)	01 (10,00)	-	-	-	-	-
70 —	80	08 (80,00)	-	-	01 (10,00)	-	-	-	-	-	-	01 (10,00)
80 —	90	05 (50,00)	01 (10,00)	02 (20,00)	01 (10,00)	-	-	-	-	-	-	01 (10,00)
90 —	101	06 (60,00)	02 (20,00)	02 (20,00)	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	40	40 (40,00)	15 (15,00)	19 (19,00)	15 (15,00)	05 (5,00)	02 (2,00)	02 (2,00)	02 (2,00)	02 (2,00)	02 (2,00)	02 (2,00)

p = prevalência esperada (60%).

Z = grau de confiança (1,96%).

d = margem de erro esperada (10%).

n = 256 hemossoros.

4.3. Delineamento experimental

Neste trabalho, utilizaram-se 264 hemossoros de bovinos oriundos de 10 municípios do Estado de Minas Gerais, sendo eles Capitão Enéas, Francisco Sã, Gurinhatã, Ituiutaba, Janaúba, Juramento, Montes Claros, Juiz de Fora, São Pedros dos Ferros, Varzelândia (TAB. II).

Todos os hemossoros foram colhidos de animais adultos, com ou sem histórico clínico da doença.

Foram colhidos 30, 26, 14 e sete hemossoros de animais provenientes de rebanhos com histórico de transtornos reprodutivos como aborto, natimorto e repetição de cio nos municípios de Ituiutaba, Juiz de Fora, Juramento e Varzelândia, respectivamente, sendo negativos para brucelose, leptospirose (TAB. III).

Os demais hemossoros foram obtidos em salas de abate de frigoríficos da região metropolitana de Belo Horizonte e não tinham histórico de doença.

Utilizaram-se tubos de 10 ml, próprios para sangria ("vacuteiner") e após a colheita, o sangue foi deixado em repouso à temperatura ambiente, até a formação do coágulo. O transporte para o laboratório realizou-se sob refrigeração e então separaram-se os hemossoros, estocando-os a -20°C , até o momento do teste.

4.3.1. Vírus de referência

O vírus de referência foi a amostra Oregon C₂₄V, originária dos EEUU da América e obtida na Dinamarca pela Empre

TABELA II - Títulos neutralizantes para BYD-DM observados em 264 amostras sorológicas de bovinos provenientes de municípios de Minas Gerais, 1988

Municípios	Número de soros testados	Títulos neutralizantes										
		1:4 (%)	1:8 (%)	1:16 (%)	1:32 (%)	1:64 (%)	1:128 (%)	1:256 (%)	1:512 (%)			
Capitão Enéas	40	19 (47,50)	02 (5,00)	09 (22,50)	04 (10,00)	04 (10,00)	02 (5,00)	-	-	-	-	
Francisco Sá	08	02 (25,00)	03 (37,50)	03 (37,50)	-	-	-	-	-	-	-	
Gurinhata	20	04 (20,00)	07 (35,00)	05 (25,00)	03 (15,00)	-	01 (5,00)	-	-	-	-	
Ituiutaba	80	23 (28,75)	13 (16,25)	20 (25,00)	13 (16,25)	02 (2,50)	03 (3,75)	02 (2,50)	04 (5,00)	-	-	
Janaúba	40	06 (15,00)	11 (27,50)	09 (22,50)	09 (22,50)	02 (5,00)	01 (2,50)	01 (2,50)	01 (2,50)	-	-	
Juramento	14	-	06 (42,86)	03 (21,43)	03 (21,43)	01 (7,14)	-	-	-	-	-	
Montes Claros	25	05 (20,00)	03 (12,00)	06 (24,00)	05 (20,00)	02 (8,00)	03 (12,00)	-	01 (4,00)	-	-	
Juiz de Fora	26	05 (19,23)	02 (7,69)	06 (23,00)	05 (19,08)	06 (23,08)	01 (3,85)	-	01 (3,85)	-	-	
São Pedro dos Ferros	04	01 (25,00)	01 (25,00)	-	-	-	01 (25,00)	01 (25,00)	-	-	-	
Varzelândia	07	-	04 (57,14)	01 (14,29)	01 (14,29)	01 (14,29)	-	-	-	-	-	
Total	264	65 (24,62)	52 (19,70)	62 (23,48)	43 (16,29)	18 (6,82)	13 (4,92)	04 (1,52)	07 (2,65)	01 (2,65)	01 (2,65)	

TABELA III - Títulos sorológicos para BVD-DM observados em rebanhos bovinos com histórico de problemas reprodutivos no Estado de Minas Gerais, 1988

	T í t u l o s e n c o n t r a d o s											
	Número de so- ros testados		1:4 (%)	1:8 (%)	1:16 (%)	1:32 (%)	1:64 (%)	1:128 (%)	1:256 (%)	1:512 (%)		
Ituutaba	30	09 (30,00)	03 (10,00)	07 (23,33)	04 (13,33)	02 (6,67)	02 (6,67)	01 (3,33)	02 (6,67)	01 (3,33)	02 (6,67)	01 (3,33)
Juiz de Fora	26	05 (19,23)	02 (7,69)	06 (23,08)	05 (19,23)	06 (23,08)	01 (3,85)	-	01 (3,85)	-	01 (3,85)	-
Juramento	14	-	06 (42,86)	03 (21,43)	01 (7,14)	01 (7,14)	01 (7,14)	-	01 (7,14)	-	-	-
Varzelândia	07	-	04 (57,14)	01 (14,29)	01 (14,29)	01 (14,29)	-	-	-	-	-	-
Total	77	14 (18,18)	15 (19,48)	17 (22,08)	13 (16,88)	10 (12,99)	04 (5,19)	01 (1,30)	03 (3,90)	01 (1,30)	03 (3,90)	01 (1,30)



sa de Pesquisa Agropecuária da Bahia (EPABA)*.

4.3.2. Cultivos celulares

Nos cultivos celulares, utilizaram-se os meios MEM-Eagle** filtrado e suplementado com 8-10% de soro fetal bovino (SFB)*** inativado previamente a 56^oC por 30 minutos. Para evidênciação do vírus foi utilizado meio de manutenção (MM) idêntico ao de crescimento (MC), exceto por conter 0-2% de SFB.

Empregou-se ainda a linhagem celular MDBK**** (MADIN & DARBY bovine Kidney). As monocamadas celulares foram lavadas com salina fosfatada (PBS) pH 7,2 e incubadas a 37^oC por cinco minutos, em solução de tripsina versene (STV), preparada com tripsina***** a 0,5% em ácido etilenodiaminotetracético***** (EDTA). A suspensão assim obtida, foi diluída em MC na concentração de 5×10^5 células/ml e mantida sob agitação magnética até o momento do uso.

4.3.3. Técnica utilizada

A técnica de soroneutralização foi conduzida segundo ROSSI & KIESEL (1971) modificada conforme descrito abaixo.

A cepa do vírus BVD-DM foi titulada em microplaca estéril de fundo plano, usando-se diluições decimais. Utilizaram-se quatro poços para cada diluição. As diluições foram realizadas em MM. Em cada poço de microplaca foi adicionado 0,025 ml de MM + 0,025 ml da diluição do vírus + 0,025 ml de suspen-

* Cedida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia (EPABA), Salvador (Brasil).

** GIBCO - Laboratório, Grand Island, New York (USA).

*** LABORCLIN - Produtos para Laboratório Ltda, Paraná (Brasil).

**** Cedida pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa, Rio de Janeiro (Brasil).

***** DIFCO - Laboratórios, Detroit, Michigan (USA).

***** REAGEN - Quimibrás Ind. Quim. S/A, Rio de Janeiro (Brasil).

são celular (5×10^5 células/ml). Nos poços de controle de MM foram adicionados 0,075 ml de MM; no controle de células adicionou-se 0,050 ml de MM + 0,025 ml de suspensão celular. O controle do vírus constou de 0,025 ml de MM + 0,025 ml de vírus (não diluído) + 0,025 ml de suspensão celular.

A microplaca foi incubada a 37°C em atmosfera de CO_2 (5% CO_2) e a leitura realizada após três a cinco dias. O cálculo do ponto final 50% foi realizado pelo método REED & MUENCH (1938).

Para a produção do antígeno, as garrafas Roux apresentando 75% de confluência celular foram lavadas com PBS pH 7,2 e inoculadas com $10^{5,5}$ DICC₅₀/ml do vírus BVD-DM. Após período de 60 minutos a 37°C foi adicionado MM e as garrafas incubadas em estufa CO_2 (5% CO_2) a 37°C por quatro dias. Depois de três ciclos de congelamento e descongelamento, o fluido de células infectadas com o vírus foi centrifugado a 1.500 r.p.m por 30 minutos a -4°C . O sedimento resultante foi suspenso em MM e distribuiu-se a suspensão em alíquotas de um ml. Estocou-se a -70°C .

Os hemossoros testados foram diluídos a 1:2 em MM e inativados a 56°C por 30 minutos, antes de serem testados. Distribuiu-se 0,025 ml de MM nos poços da microplaca. Adicionou-se 0,025 ml de hemossoro diluído a 1:2 em dois ou quatro poços da microplaca. Fez-se diluição dupla seriada com auxílio de microdiluidor calibrado para 0,025 ml. Após a diluição do soro (1:4 a 1:512), adicionou-se 0,025 ml de vírus (200 DICC₅₀/0,025 ml) e incubou-se a 37°C em atmosfera de CO_2 (5%) por 60 minutos. Após este período foi adicionado 0,025 ml de suspensão celular (5×10^5 células/ml). O procedimento para realização dos controles (MM, vírus e células) foi idêntico ao da titulação do vírus. A microplaca foi incubada a 37°C em atmosfera de CO_2 durante três a sete dias quando se realizou leitura (após coloração com cristal violeta) em microscópio invertido. O título do soro em teste correspondeu a maior diluição de soro que apresentou reação negativa (ausência de ECP e/ou células coradas em azul).

5. RESULTADOS

Num total de 100 hemossoros analisados no prē-experimento, 40% apresentaram-se negativos para o vīrus BVD. Os 60% positivos distribuīram-se em tītulos 1:8 (15,00%), 1:16 (19,00%), 1:32 (15,00%), 1:64 (5,00%), 1:128 (2,00%), 1:256 (2,00%), 1:512 (2,00%) (TAB. I).

Atravēs do teste de soroneutralizaçāo em placa, foram testados um total de 264 hemossoros bovinos, onde, 187 foram obtidos em matadouro e 77 oriundos de rebanhos com problemas reprodutivos. O teste evidenciou a presença de anticorpos neutralizantes para vīrus BVD em 199, dando um percentual de 75,38% de bovinos positivos. Destes, 52 (19,70%), 62 (23,48%), 43 (16,29%), 18 (6,82%), 13 (4,92%), quatro (1,52%), sete (2,65%) apresentaram tītulos 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 respectivamente (TAB. II).

Dos 77 hemossoros, 63 (81,82%) apresentaram tītulos > 1:4 assim distribuīdos 1:8 (19,48%), 1:16 (22,08%), 1:32 (16,88%), 1:64 (12,99%), 1:128 (5,19%), 1:256 (1,30%) e 1:512 (2,90%), (TAB. III).

Todos os hemossoros provenientes dos municīpios de Juramento e Varzelândia foram colhidos de rebanhos problemas e todos apresen-aram tītulos > 1:4. Os 14 hemossoros provenientes do municīpio de Juramento, apresentaram variaçāo de tītulos de 1:8 a 1:128, e os sete hemossoros do municīpio de Varzelândia de 1:8 a 1:64 (TAB. III).



6. DISCUSSÃO

Dos 264 hemossoros testados, 199 apresentaram anticorpos neutralizantes para vírus BVD, dando um percentual de 75,38% de bovinos positivos. O percentual encontrado está de acordo com o obtido por PABLO CORREA et alii (1976), que encontraram 75% de soros positivos para vírus BVD no Estado do México. Resultados diferentes foram obtidos por HAFEZ et alii (1976), OKEKE (1976), HARKNESS et alii (1978), RICE & JENNEY (1979), SUZAN et alii (1983), HOWARD et alii (1986), EDWARDS et alii (1987) que obtiveram 48,0%, 13,4%, 62,0%, 96,7%, 70,5%, 0,8%, 64,9% de soros positivos para vírus BVD, respectivamente.

O percentual de hemossoros bovinos com anticorpos neutralizantes para vírus BVD encontrado neste trabalho foi superior ao relatado por outros pesquisadores em outros Estados do Brasil. WIZIGMANN et alii (1972) testando 229 amostra de soros bovinos no Rio Grande do Sul obtiveram 39% de positivos para BVD e em São Paulo, SOARES & PEREIRA (1974) trabalhando com 59 soros, obtiveram um resultado de 42,1% de positivos. Isto sugere que o vírus BVD está se disseminando rapidamente por todo o nosso rebanho, juntamente com o aumento de observações de problemas reprodutivos. Apesar da disseminação do vírus BVD em nosso rebanho, não se pode afirmar que ele esteja produzindo a doença clínica. Para isto, seria necessário acompanhamento sorológico dos animais ou isolamento do vírus de animais com sin

tomatologia clínica.

CARBREY et alii (1971) afirmam que títulos 1:4 indicam que o animal sofreu infecção pelo vírus BVD por vacina ou imunidade passiva, através do colostro. No presente trabalho, considerou-se título: 1:4 como negativo e nenhum hemossoro analisado obteve título < 1:4. Como são se trabalhou com animais adultos, título 1:4 não pode estar relacionado com a ingestão de colostro ou vacina, visto que esta não existe no Brasil.

Os títulos positivos variaram de 1:8 a 1:512, sendo que a grande maioria (66,29%) permaneceu entre 1:8 a 1:64. Títulos entre 1:128 a 1:256 corresponderam a 6,44% e o título de 1:512 apareceu em apenas 2,65% do total de soros examinados. Isto indica apenas a presença do vírus. A hipótese de que seja um início de infecção ou queda final de anticorpos, não pode ser comprovada. Para se tirar uma conclusão definitiva seria necessário, acompanhamento sorológico dos animais, utilizando-se sorologia pareada, o que está de acordo com o afirmado por CARBREY et alii (1971).

Dos 77 hemossoros provenientes de rebanhos com histórico de problemas reprodutivos, 71,43% (55 hemossoros) tinham títulos entre 1:8 e 1:64, 10,39% (oito hemossoros) tinham títulos entre 1:128 e 1:512. Nos municípios de Juramento e Varzelândia não foram encontrados animais negativos, sendo que o título mínimo obtido foi 1:8. Estes resultados sugerem que os animais fossem expostos ao vírus. BACKER (1987) afirmou que bovinos imunotolerantes no vírus BVD, estão persistentemente infectados e virêmicos, podendo ter ou não baixas concentrações de anticorpos neutralizantes específicos e aparentarem-se saudios, porém isto não foi estudado neste trabalho. Quanto a presença de títulos baixos na amostra sorológica, proveniente de rebanhos problemas, pode tratar-se de início de infecção, porém para confirmação desta hipótese seria necessário o isolamento do vírus destes animais, ou a realização de sorologia pareada.

7. CONCLUSÕES

Pelo teste de soroneutralização em placa para BVD (microtécnica) realizados em 264 hemossoros de bovinos adultos, foram encontrados 75,38% de soros positivos, o que permite concluir que o vírus da Diarréia Bovina a Vírus, está presente no rebanho mineiro.

Como não foi possível realizar a sorologia pareada os resultados obtidos indicam apenas que os animais tiveram contacto com o vírus, sem contudo precisar se os títulos de anticorpos anti-BVD estavam em ascensão ou em regressão. Por este teste não se pode afirmar que existe a doença clínica. No entanto a taxa de 75,38% de infecção é muito alta em nossos rebanhos.

É necessário que se faça outros trabalhos com testes pareados, isolamento do vírus de casos clínicos para se situar melhor a importância da BVD no rebanho mineiro.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMES, T.R. The causative agente of BVD: it's epidemiology and pathogenesis. *Vet. Med.*, Bonner Springer, 81(9):848-85, 1986.
2. ANIMAL HEALTH YEARBOOK, Rome, n. 26, 1986. p.49.
3. ARCHBALD, L.F. & ZEMJANIS, R. Intrauterine infusion of the bovine virus diarrhea and artificial insemination in the cow at estrus. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, Bornner Springs, 72(2):221-5, 1977.
4. BACKER, J.C. Bovine viral diarrhea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 190(11):1449-58, 1987.
5. BERRIOT, C. La maladie des muqueuses chez le veau. *Bull. Soc. Vet. Prat. France*, 64(6):453-64, 1980.
6. BUXTON, A. & FRASER, G. *Animal microbiology*. Oxford, Blackwell Scientig Publications, 1977. v.2. p.657-60.
7. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. *Procedimento para estudos de prevalencia por muestro*. Buenos Aires, 1979. 35p.
8. CARBREY, E.A.; BROWN, L.N.; CHOW, T.L.; KAHRIS, D.G.; Mc KERCHER, L.K.; TAMOGLIA, T.W. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhea, and shipping fever

- (Parainfluenza - 3). *Proceedings U.S. Animal Health Association*, Washington, 75:629-48, 1971.
9. COGGISN, L. Standardization of virus-neutralization test for bovine virus diarrhoea. *Am. H. Vet. Res.*, Schaumburg, 25(104):103-7, 1964.
 10. CORREA, W.M.; ZEZZANETO, L.; BARROS, H.M.; GOTTSCHARLK, A. F. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 35:141-51, 1968.
 11. DANNACHER, G. & MARTEL, J.L. Le titrage des anticorps contre le virus de la maladie des muqueuses par une micrométre de séroneutralisation. *Rec. Med. Vét.*, Alfort, 154(1):31-7, 1978.
 12. DUFFEL, M.W. & SHARP, D.B. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. *Vet. Rec.*, London, 118(1):38-9, 1986.
 13. EDWARDS, S.; DREW, T.W.; BUSHNELL, S.E. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia. *Vet. Rec.*, London, 120(3):71, 1987.
 14. FERNELIUS, A.L.; LAMBERT, G.; HEMNESS, G.J. Bovine viral diarrhoea virus-host cell interactions: adaptation and growth of virus in cell lines. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 30(7):1561-72, 1969.
 15. GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A.; McENTEE, K. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.*, Ithaca, 50:73-9, 1960.
 16. GILLESPIE, J.H.; COGGINS, L.; THOMPSON, J.; BAKER, J. A. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *Cornell Vet.*, Ithaca, 51(1):155-9, 1961.
 17. GRAHN, T.C.; FAHNING, M.L.; ZEMJANIS, R. Nature or early reproductive failure caused by bovine viral diarrhoea vi-

- rus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 185(4):429-32, 1984.
18. HAFEZ, S.M.; LIESS, B.; FREY, H.R. Studies on the natural occurrence of neutralizing antibodies against six strains of bovine viral diarrhoea virus in field sera of cattle. *Zentralbl. Veterinärmed Reihe B*, Hamburg, 23(8)669-77, 1976.
 19. HARKNESS, J.W.; SANDS, J.J.; RICHARDS, M.S. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res. Vet. Sci.*, London, 24(1):98-103, 1978.
 20. HEUSCHELE, W.P. New perspectives on the epidemiology of Bovine Virus Diarrhoea-Mucosal Disease (BVD). *Bovine Pract.*, West Lafayette, (13):51-3, 1978.
 21. HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, 13(4):361-9, 1987.
 22. HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J.; THOMAS, L.H. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia in cattle in the UK. *Vet., Rec.*, London, 119(25/26):628-9, 1986.
 23. HUCK, R.A. Some recently isolated viruses from cattle. *Vet. Bull*, Farnham Royal, 32(8):493-504, 1962.
 24. JENNEY, E.W. & WESSMAN, S.J. Microtitration serology methods for bovine virology. In: SEROLOGIC MICROTITRATION TECHNIQUES, Ames, 1978. Ames, National Veterinary Services Laboratories, 1978, p.16-20.
 25. JUSTEWICZ, D.M.; MAGAR, R.; MARSOLAIS, G.; LECOMTE, J. Bovine viral diarrhoea virus-infected MDBK monolayer as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of antibodies in bovine sera. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, 14(4):377-84, 1987.

26. KATZ, J.B.; LUDEMANN, L.; PEMBERTON, J.; SCHMERR, M. J. Detection of bovine virus diarrhoea virus in cell culture and immunoperoxidase technique. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, 13(2):153-7, 1987.
27. LEE, K.M.; & GILLESPIE, J.H. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 18(69):952-3, 1957.
28. MAHIN, L.; CHADLI, M.; BRIOUGA, J.; HAMIDE, M.; WELLWMANS, G. Clinical bovine virus diarrhoea in Morocco. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B*, Hamburg, 29(10):789-93, 1982.
29. MARCUS, S.J. & MOLL, T. Adaptation of bovine viral diarrhoea virus to the MDBK cell line. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 29(4):817-9, 1968.
30. MOHANTY, S.B. & DUTTA, S.K. *Veterinary virology*, Philadelphia, Lea & Febiger, 1981. p.127-9.
31. MOSSMAN, D.H. & HANLY, G.J. The spread of bovine viral diarrhoea on the East Coast. *N. Z. Vet. J.*, Wellington, 24(6):108-10, 1976.
32. NETTLETON, P.F.; BARLOW, R.M.; GARDINER, A.C.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. La pathogénie et l'épidémiologie de l'infection par le virus BVD. *Ann. Méd. Vét.*, Brussels, 129(2):93-108, 1985.
33. OHMANN, H.B. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea - mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res. Vet. Sci.*, London, 34(1):5-10, 1983.
34. OKEKE, E.N. A survey of rinderpest-like diseases in Northern Nigeria: preliminary serological evidence for the occurrence of bovine virus diarrhoea. *Bull. Anim. Health Prod. Africa*, Nairobi, 24(1):5-8, 1976.
35. OLAFSON, P.; McCALLUM, A.D.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, Ithaca, 36:205-13, 1946.

36. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Programa de adiestramiento en salud animal para America Latina: Cuarentena animal-enfermedades cuarentenables*. Washington, 1986. v. 1, 374p.
37. PABLO CORREA, M.A.; BROWN, D.L.N.; BRYNER, J.H. Presencia de anticuerpos contra rinotracheitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y *Haemophilus somnus* en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. *Tea Pecu. Mex.*, México, 29:26-33, 1976.
38. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, 27(3):493-7, 1938.
39. RICE, D.A. & JENNEY, E.W. Serological evidence of infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhoea and parainfluenza e viruses in calves in El Salvador. *Trop. Anim. Health Prod.*, Edinburg, 11(2):123-4, 1979.
40. ROBSON, D.S.; GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A. The neutralization test as an indicator of immunity to virus diarrhoea. *Cornell Vet.*, Ithaca, 50:503-9, 1960.
41. ROSSI, C.R. & KIESEL, G.K. Microtiter tests for detecting antibody in bovine serum to parainfluenza 3 virus, infectious bovine rhinotracheitis virus, and bovine virus diarrhoea virus. *App. Microbiol.*, Washington, 22(1):32-6, 1971.
42. RUTH, G.R. Bovine viral diarrhoea: a difficult infection to diagnose. *Vet. Med.*, Bonner Springer, 81(9):870-4, 1986.
43. SHARPE, R.T.; BICKNELL, S.R.; HUNTER, A.R. Concurrent malignant catarrhal fever and bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd. *Vet. Rec.*, London, 120(23): 545-8, 1987.
44. SINGH, K.V.; HAJJ, A.; BARGHOUT, R. A survey of neutralizing antibodies to infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine virus diarrhoea mucosal disease (BVD-MD) and parainfluenza type 3 (PI-3) viruses in cattle in Lebanon and

- some other countries of the middle east. *Bull. Anim. Health Prod. Africa*, Nairobi, 25(1):85-9, 1977.
45. SOARES, L.A. & PEREIRA, O.A.C. Neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD) virus in cattle sera from São Paulo State, Brazil. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 5(11):1-5, 1974.
46. SUZAN, M.V.; ONUMA, M.; AGULAR, R.E.; MURAKAMI, Y. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn. J. Vet. Res.*, Sapporo, 31(3/4):125-32, 1983.
47. TARABLA, H.D.; VOTERO, D.A.J.; LAGER, I.A. Diagnóstico serológico y características epizootiológicas dos casos de diarrrea vírica bovina-enfermedad de las mucosas. *Gaceta Vet.*, Buenos Aires, 42(354):588-93, 1980.
48. VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. "Desiderio Finamor"*, Porto Alegre, 2:51-8, 1974.
49. WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z.M.T. Investigações serológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus da diarréia a vírus-enfermedad das mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. "Desiderio Finamor"*, Porto Alegre, 1:52-8, 1972.