

PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA A DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) DO ESTADO DO PARÁ

René Ribeiro da Silva¹
Silvio Orlan de Castro Chaves¹
Onel Solano Garcia²
Hilma Lúcia Tavares Dias³

RESUMO

A diarreia viral bovina é uma enfermidade infectocontagiosa que afeta os bovídeos, causada por um vírus do gênero *Pestivirus*. As manifestações clínicas vão desde infecções agudas até alterações reprodutivas, incluindo infecções pré-natais capazes de levar ao quadro denominado "Doença das mucosas". O uso de testes diagnósticos indiretos pode indicar o contato prévio dos animais com o vírus, direcionando medidas de controle para ocasionais infecções no rebanho bubalino. Desta forma, 805 amostras de sangue de bubalinos de 44 rebanhos, provenientes de 13 municípios do estado do Pará foram submetidas ao Ensaio imunoenzimático indireto, para detectar a presença de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Verificou-se que 113 (14%) animais, 24 (54,4%) rebanhos apresentavam anticorpos para BVDV e em 77% dos municípios examinados houve pelo menos um animal reagente. A diferença encontrada entre as frequências de ocorrência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina quando comparada as mesorregiões do estado, sugere que existem diferentes fatores envolvidos na exposição dos animais nos diferentes rebanhos. Estudos relacionados a fatores de risco são imprescindíveis para esclarecer tais divergências e determinar quais são as medidas de controle mais indicadas.

Palavras-chave: bubalinos, vírus da diarreia viral bovina, ELISA, Pará.

ANTIBODIES AGAINST BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) IN BUFFALOES (*Bubalus bubalis*) HERDS FROM PARÁ STATE

ABSTRACT

The bovine viral diarrhea is an infectious disease that affects bovines caused by a virus of the genus *Pestivirus*. The clinical manifestations ranging from acute infection to reproductive alterations, including prenatal infections capable of leading to the condition known as "mucosal disease". The use of indirect diagnostic tests may indicate prior contact with the animal virus, directing control measures to occasional infections in buffalo herd. Thus, 805 blood samples from 44 herds of buffaloes, from 13 municipal districts in the state were subjected to indirect ELISA to detect the presence of antibodies to bovine viral diarrhea virus in buffaloes of Para. It was observed that 113 (14%) animals, 24 (54.4%) herds had antibodies to BVDV and in 77% of municipal districts were examined at least one buffalo seropositive.

¹ Médico Veterinário, Fiscal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.

² Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ.

³ Médica Veterinária, Professora Associado II, lotada no Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural da Universidade Federal do Pará, área de Medicina Veterinária Preventiva. Contato para correspondência.

The difference between the frequencies of occurrence of antibodies against BVDV compared the regions state, suggests that there are different factors involved in the exposure of animals in different herds. Studies related to risk factors are essential to clarify these differences and determine which the most suitable control measures are.

Keywords: buffalo, bovine viral diarrhea virus, ELISA, Pará.

ANTICUERPO CONTRA LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV) EN GANADO BUFALO (*BUBALUS BUBALIS*) ESTADO PARA, BRASIL

RESUMEN

La diarrea viral bovina es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los bovinos, y es causada por un virus del género *Pestivirus*. Las manifestaciones clínicas van desde la infección aguda hasta alteraciones reproductivas, incluyendo infecciones prenatales, capaces de conducir a una enfermedad conocida como "enfermedad de las mucosas". El uso de pruebas diagnósticas indirectas puede indicar un contacto inicial de los animales con el virus, direccionando medidas de control para infecciones eventuales de un rebaño de búfalos. Por esta razón, fueron sometidos a la prueba de Ensayo Inmunoenzimático Indirecto - ELISA, 805 muestras de sangre de 44 rebaños de búfalos, provenientes de 13 municipios del Estado de Pará, con el objetivo de detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en búfalos de Pará. Se observó que 113 (14%) animales, 24 (54,4%) rebaños, tenían anticuerpos para el VDVB y en el 77% de los municipios que se examinaron hubo al menos un animal positivo. La diferencia entre las frecuencias de aparición de anticuerpos contra BVDV cuando se compararon las diferentes regiones del estado, sugiere que hay diferentes factores que intervienen en la exposición de los animales en diferentes rebaños. Estudios relacionados con los factores de riesgo son esenciales para aclarar estas diferencias y determinar cuáles son las medidas de control más adecuadas.

Palabras clave: búfalo, virus de la diarrea viral bovina, ELISA, Pará.

INTRODUÇÃO

A diarrea viral bovina ou Bovine Virus Diarrhoea (BVD) pode provocar manifestações clínicas que vão desde infecções agudas até alterações reprodutivas, com destaque para baixa eficiência reprodutiva, infertilidade, mortes embrionárias, repetição de cio, abortos, nascimentos de bezerras com defeitos congênitos e desenvolvimento retardado (1,2,3), incluindo infecções pré-natais capazes de levar a um quadro possivelmente fatal denominado "Doença das Mucosas".

No final da década de setenta e início dos anos oitenta, começava-se a evidenciar a circulação do vírus da Diarrea Viral Bovina em bubalinos (4,5).

Flores et al. (6) ressaltam que nos países livres de Febre Aftosa, BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de numerosos estudos e programas. Em bubalinos no Brasil, Lage et al. (7) ao efetuarem um levantamento sorológico, chegaram a uma prevalência da infecção de 52,7%. No continente africano e asiático, estudos mostraram uma soroprevalência de 52% nos búfalos examinados (8,9,10).

A transmissão da enfermidade pode ocorrer normalmente por contato direto com portadores (corrimento nasal, saliva, sêmen, fezes, urina e leite); via transplacentária; por meio de vacinas vivas modificadas ou vacinas contra outras enfermidades que estejam contaminadas com BVDV; soro fetal que é usado em transferência de embriões ou produção de vacinas (2,11,12). Medidas de manejo tais como a compra de animais sem o conhecimento do histórico sanitário ou de vacinação, aquisição de fêmeas carregando fetos persistentemente infectados (PI), pobre esquema de vacinação e concentração de um grande número de animais em áreas relativamente pequenas, podem levar a uma fácil disseminação do BVDV (13,14,15).

De acordo com Sandvik (16), os ensaios imunoenzimáticos são métodos diagnósticos capazes de detectar praticamente qualquer molécula imunoreativa. São amplamente utilizados para exames da infecção por BVDV em grandes rebanhos, pois não necessitam cultura celular. Os resultados podem ser obtidos em algumas horas. Os testes são convenientes, principalmente, para sangue e leite; a leitura é automatizada excluindo erros subjetivos. Outros testes como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) e a imunohistoquímica são ferramentas importantes na investigação da circulação das estirpes promotoras de infecções naturais tanto em bovinos quanto em bubalinos (17,18,19).

De acordo com Fredriksen et al. (20) e Beaudeau et al. (21), os testes ELISA indireto que utilizam a proteína não estrutural, presente em todas as amostras virais, tem um papel extremamente importante na sorologia da BVD, já que demonstrariam com eficiência os anticorpos originados por uma infecção, chegando a uma sensibilidade e especificidade de 96,9 % e 97,3 %, respectivamente. Os estudos soropidemiológicos para BVD no mundo e no Brasil em sua maioria foram realizados utilizando a prova de soroneutralização (SN), um teste de especificidade e sensibilidade bastante comprovadas. No entanto, Flores et al. (22) demonstraram que testes de SN utilizando vírus de apenas um genótipo podem resultar em um número significativo de falsos-negativos.

Tendo em vista que existem poucas informações a respeito da diarreia viral bovina em rebanhos bubalinos na região norte, a presente pesquisa teve como objetivo evidenciar a presença de anticorpos contra BVDV em bubalinos criados no estado do Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas, por conveniência, 805 amostras de sangue de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, Carabao, Jafarabadi e mestiços, ambos os sexos, com idade superior a doze meses, pertencentes a 44 rebanhos, três mesorregiões e 13 municípios do estado do Pará.

As amostras de sangue foram colhidas pela punção da veia jugular com seringa tipo Vacutainer e em seguida mantidas em refrigeração e transportadas até o laboratório, onde foram centrifugadas e os soros armazenados em tubos tipo *Eppendorf* a -20°C até o momento do uso.

Para a detecção de anticorpos contra BVDV, foi utilizado um teste ELISA indireto ("Bovine Virus Diarrhoea Virus BVDV-ab ELISA kit"¹). Todos os procedimentos foram executados segundo a recomendação do fabricante. Os soros foram diluídos em duplicata na diluição de 1:25. Nas placas, já sensibilizadas com o antígeno NS2-3, foram adicionados 4 µL de soro positivo e soro negativo em orifícios da microplaca e 4 µL dos soros teste nos

¹ SVANOVA TM Biotech S – 751 83 Uppsala, Suécia

orifícios ordenados para este fim em duplicata. Após 1 hora de incubação à temperatura de 37°C, as placas foram submetidas a um ciclo de três lavagens e posteriormente foram acrescentados 100 µL de conjugado em todos os orifícios e incubou-se a 37°C por 1 hora, novamente. Em seguida, outro ciclo de lavagens e, finalmente, a adição do substrato em todos os orifícios seguida de nova incubação por 15 minutos. Adicionou-se 50 µL de solução “stop” H₂SO₄ 2M em todos os orifícios, para posterior leitura em espectrofotômetro, utilizando filtro de 450 nanômetros.

Para fins de análise estatística, os municípios foram agrupados em três mesorregiões, segundo o mapa político do estado. Os resultados obtidos nas três mesorregiões foram comparados pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($p=0,05$), procurando-se determinar diferenças entre as regiões estudadas (23).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas mesorregiões nordeste e metropolitana de Belém os bubalinos eram vermifugados e vacinados contra febre aftosa, clostridioses e raiva. No entanto, nos animais pertencentes à mesorregião do Marajó não se conhecia o histórico de sanidade dos animais. Nos rebanhos bubalinos analisados não se adotava a vacinação contra BVDV. O rebanho foi considerado positivo quando se detectou pelo menos um animal reagente para BVDV.

Os resultados obtidos (Tabela 1) demonstraram que anticorpos para a diarreia viral bovina ocorrem nos rebanhos bubalinos dos municípios do estado do Pará. Dos treze municípios investigados, 10 (77%) apresentaram pelo menos um animal positivo para anticorpos BVDV.

Tabela 1. Frequências absolutas (f) e relativas (%) de animais positivos e negativos para anticorpos BVDV em 13 municípios do estado do Pará.

Município	Animais examinados	Animais negativos	%	Animais positivos	%
Belém	30	29	96,64	1	3,33
Benevides	15	15	100	0	0
Bujarú	12	12	100	0	0
Santa Isabel do Pará	84	75	89,29	9	10,71
Castanhal	54	44	81,48	10	18,52
Mojú	128	104	81,25	24	18,75
Peixe-boi	71	56	78,87	15	21,13
Cachoeira do Arari	52	48	92,31	4	7,69
Chaves	164	150	91,46	14	8,54
Ponta de Pedras	18	18	100	0	0
Salvaterra	32	21	65,62	11	34,38
Soure	54	41	75,93	13	24,07
Santa Cruz do Arari	91	79	86,81	12	13,19
Total	805	692	85,96	113	14,04

A análise dos dados obtidos neste estudo por mesorregiões revelou diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2=7,7$, G.L=2, $p=0,02$) quando se comparam os resultados obtidos entre as três mesorregiões.

Observou-se que entre a mesorregião metropolitana de Belém e Marajó não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=1,02$, G.L=1, $p=0,31$), entretanto, entre

a mesorregião metropolitana de Belém e a mesorregião nordeste foi encontrada diferença estatística significativa ($\chi^2=6,75$, G.L=1, $p=0,009$) e entre a mesorregião do Marajó e a mesorregião nordeste constatou-se diferença estatística significativa ($\chi^2=4,32$ G. L=1, $p=0,03$).

Estudo semelhante foi realizado por Langoni et al. (24) em São Paulo, ao analisar 405 amostras sanguíneas de bovinos por meio de um ELISA indireto comercial, em que foi dividido os municípios em três regiões, sendo que não foram encontradas diferenças significativas (33,3%) dos animais reagiram positivamente. No entanto, na Venezuela, Obando et al. (25) também utilizando um ELISA indireto, evidenciaram 36% de soropositividade, encontrando diferenças altamente significativas entre as cinco regiões estudadas.

A ocorrência de animais reagentes para BVDV variou entre 10,26% e 19,60% (Tabela 2). Esses percentuais de bubalinos caracterizados reagentes para BVD foram inferiores ao registrado em outras regiões do Brasil, Minas Gerais (31,1% e 52,7%), São Paulo (39,2%), Pernambuco (72,8%), Rio Grande do Sul (56%) e Goiás (34,5%) (7,26,27,28,29).

Tabela 2. Frequências absolutas (f) e relativas (%) de bubalinos positivos e negativos para anticorpos BVDV nas mesorregiões estudadas.

Mesorregiões	Positivos		Negativos		χ^2	p
	f	%	f	%		
Metropolitana de Belém (n=195)	20	10,26b	175	89,74	7,7	0,02
Marajó (n=411)	54	13,14b	357	86,86		
Nordeste (n=199)	39	19,60a	160	80,40		
TOTAL	113	14,04	692	85,96		

n Número de animais examinados por mesorregião

% seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste χ^2 a 0,05

Na análise dos rebanhos, verificou-se que de 44 rebanhos examinados, 24 (54,5%) apresentavam no mínimo um animal soropositivo (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências absolutas (f) e relativas (%) de rebanhos bubalinos positivos e negativos para anticorpos BVDV nas mesorregiões estudadas.

Mesorregiões	Positivos		Negativos		χ^2	p
	f	%	f	%		
Metropolitana de Belém (n=11)	06	54,5	05	45,4	1,0	0,60
Marajó (n=26)	13	50	13	50		
Nordeste (n=7)	05	71,4	02	28,5		
Total	24	54,5	20	45,4		

n= Número de rebanhos examinados por mesorregião

Levando-se em consideração que rebanhos infectados não apresentam o mesmo padrão regional de disseminação do BVDV (14), as diferenças observadas na literatura e, aquelas observadas nas regiões estudadas, tais como, influências climáticas, manejo, tamanho dos rebanhos, virulência do BVDV, poderiam explicar as discrepâncias observadas.

A mesorregião metropolitana de Belém e a região do Marajó apresentam clima e manejo distintos, portanto diferenças poderiam ocorrer quando os dados fossem confrontados, entretanto, estas diferenças foram destituídas de significado estatístico.

O Marajó apresenta tipo climático Ami, caracterizado pela ocorrência de duas estações bem distintas, uma seca, de julho a dezembro, e outra chuvosa, de janeiro a junho (30). Os animais são criados sem nenhuma tecnologia e vivem principalmente do pastejo, o que

acarreta baixa produtividade. Ocorre a predominância de manejo extensivo, o que proporciona uma maior separação dos animais, sugerindo um obstáculo à plena dispersão do vírus, já que o mesmo é bastante sensível às condições ambientais (2,31).

Na mesorregião metropolitana de Belém o tipo climático é do Afí, sem um período seco definido e o tipo de criação era semi-intensivo, ocorrendo uma maior aglomeração dos animais. Entretanto, nas propriedades analisadas o manejo sanitário era relevante, dificultando a disseminação do agente viral.

A região metropolitana da cidade de Belém e a região nordeste do estado, apesar de apresentarem em geral, os mesmos tipos climáticos, não demonstraram um padrão de manejo sanitário, dentro do sistema de criação semi-intensivo. Assim, diferentemente do observado nas fazendas da região metropolitana, as propriedades da mesorregião nordeste o manejo sanitário era praticamente inexistente e, nestas fazendas, a aglomeração dos animais pode ter facilitado a transmissão do vírus pelos animais infectados (11,15,32), podendo assim justificar, não só a diferença entre a área metropolitana de Belém (10,26%) e a região nordeste (19,60%), mas também a encontrada entre a região nordeste e Marajó (13,14%).

Apesar do estado do Pará ser detentor de um rebanho bubalino estimado em 507.882 cabeças (33) e da atividade estar em expansão, o controle sanitário dos animais ainda é deficiente nas áreas estudadas. Assim, animais são comprados e vendidos sem qualquer tipo de quarentena ou histórico de sanidade e, em muitos casos, a separação física entre as propriedades é precária, o que certamente contribui para a circulação do BVDV nos rebanhos analisados. Vale ressaltar, a possibilidade da existência de bubalinos PI como principal fonte de infecção e reservatório do vírus (19).

O teste ELISA utilizado nesse trabalho era de natureza comercial, sendo o mesmo empregado pela Noruega no seu programa de erradicação da doença em bovinos (34). Os estudos soroepidemiológicos para BVD no mundo e no Brasil em sua maioria foram realizados utilizando a prova de soroneutralização, um teste de sensibilidade e especificidade bastante comprovadas. No entanto, Flores et al. (22) demonstraram que testes de SN utilizando vírus de apenas um genótipo podem resultar em um número significativo de falso-negativos. O teste ELISA, empregado no presente estudo mostrou-se como uma alternativa para o diagnóstico sorológico de grandes efetivos bubalinos, capaz de detectar anticorpos específicos contra o BVDV e fornecer dados preliminares sobre a doença no estado.

CONCLUSÃO

A diferença encontrada entre as frequências de ocorrência de anticorpos contra BVDV quando comparada as mesorregiões do estado, sugere que existem diferentes fatores envolvidos na exposição dos animais nos diferentes rebanhos. Estudos relacionados a fatores de risco são imprescindíveis para esclarecer tais divergências e determinar quais são as medidas de controle mais indicadas.

REFERÊNCIAS

1. Duffell SJ, Harkness JW. Bovine virus diarrhoea–mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec.* 1985;117:240-5.
2. Corrêa WM, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos animais domésticos.* 2a ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1992. p.539-46.
3. Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologico.* 2003;31:137-43.

4. Hamblin C, Hedger RS. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/ mucosal disease virus in African Wildlife. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1979;2:295-303.
5. Ghaffar SA, Ata FA. Bovine virus diarrhoea in Egypt. *Vet Rec.* 1982;110:566.
6. Flores EF, Weiblen R, Vogel FSF, Roehe PM, Alfieri AA, Pituco EM. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil: histórico situação atual e perspectivas. *Pesqui Vet Bras.* 2005;25:125-34.
7. Lage AP, Castro RS, Melo MI, Aguiar PH, Barreto Filho JB, Leite RC. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais state, Brazil. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 1996;49:195-7.
8. Akhatar S, Asif M. Epidemiologic association between antibody titres against bovine virus diarrhoea virus, rinderpest disease virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in a buffalo herd. *Trop Anim Health Prod.* 1996;28:207-12.
9. Zaghawa A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. *J Vet Med.* 1998;45:345-51.
10. Sudharshana KJ, Suresh KB, Rajasekhar M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. *Rev Sci Tech.* 1999;18:667-71.
11. Leite RC. Diarréia bovina à vírus. In: *Anais do I Simpósio Pfizer Sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos*; 1996; Guarulhos. Guarulhos: Laboratório Pfizer; 1996. p.29-31.
12. Gard JA, Givens MD, Stringfellow D. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology.* 2007;68:434-42.
13. Dubovi EJ. Bovine viral diarrhoea virus. In: *Anais do Encontro Internacional Sobre Herpesvírus Bovino (Tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)*; 1998; Santa Maria. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 1998. p.1-19.
14. Ezanno P, Fourichon C, Viet AF, Seegers H. Sensitivity analysis to identify key-parameters in modelling the spread of bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. *Prev Vet Med.* 2007;80:49-64.
15. Stahl K, Lindberg A, Rivera H, Ortiz C, Moreno-López J. Self clearance from BVDV infections: a frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru. *Prev Vet Med.* 2008;83:285-96.
16. Sandvik T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 1999;64:123-34.

17. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol.* 1994;136:309-23.
18. Cortez A, Castro AMG, Heinemann MB, Soares RM, Leite RC, Scarcelli E, et al. Detecção de ácidos nucléicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58:1226-8.
19. Craig MI, Venzano A, Moris WE, Jimenez L, Julia S, Capellino F, et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci.* 2008;85:194-6.
20. Fredriksen B, Sandvik T, Loken T, Odegaard SA. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec.* 1999;144:111-4.
21. Beaudeau F, Assié S, Seegers H, Belloc C, Sellal E, Joly A. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet Rec.* 2001;149:236-40.
22. Flores EF, Weiblen R, Gil LHV, Tobias FL, Lima M, Garcez DC, et al. Diversidade antigênica de amostras do vírus da Diarreia Viral Bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52:18-22.
23. Beiguelman B. Curso prático de bioestatística. 4a ed. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética; 1996.
24. Langoni H, Paes AC, Silva AV, Tonin FB, Kung D. Inquérito sorológico para a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (RIB) e Diarreia a Vírus dos Bovinos (DVB). *Vet Not.* 1999;5:121-4.
25. Obando RC, Hidalgo M, Merza M, Montoya A, Klingeborn B, Moreno-Lopez J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med.* 1999;41:271-8.
26. Castro RS, Melo LEH, Abreu SRO, Muniz AMM, Albuquerque APS. Anticorpos neutralizantes contra Pestivirus em soros bovinos do Estado de Pernambuco. *Pesqui Agropecu Bras.* 1993;28:1327-31.
27. Canal CW, Strasser M, Hertig C, Masuda A, Peterhans E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol.* 1998;63:85-97.
28. Brito WMED, Souza WJ, Vieira S, Linhares DCL, Barbosa ACVC, Alfaia BT. Serological study on bovine viral diarrhoea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. *Virus Res.* 2002;7:144.

29. Dias FC, Alexandrino B, Medeiros ASR, Dias EC, Buzinaro MG, Samara SI. Ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o BVDV-1 e o BVDV-2 em rebanhos bovinos de Minas Gerais e São Paulo, Brasil. *Ars Vet.* 2011;27:161-7.
30. Bastos TX, Rocha EJP, Rolim PAM, Diniz TDAS, Santos ECR, Obre RAA, et al. O estado atual dos conhecimentos de clima da Amazônia brasileira com finalidade agrícola. In: *Anais do I Simpósio do Trópico Úmido*; 1984; Belém. Belém: Embrapa-CPATU; 1986. p.19-43.
31. Depner K. Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev Sci Tech.* 1992;11:885-93.
32. Leite RC. Controle de Diarréia Bovina à Vírus (DBV) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). *Rev Bras Reprod Anim.* 1999;23:531-5.
33. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa pecuária municipal [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2013 [cited 2015 May 09]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pa&tema=pecuaria2013>.
34. Valle PS, Skjerve E. Time to first calving and calving interval in bovine virus diarrhea virus (BVDV) sero-converted dairy herds in Norway. *Prev Vet Med.* 2001;51:17-36.

Recebido em: 20/05/2015

Aceito em: 11/07/2016