

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TESTES DE ELISA E VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO NA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA NO SORO E LEITE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diego Artemio Franco Sturza

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**TESTES DE ELISA E VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO NA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA NO SORO E LEITE**

Diego Artemio Franco Sturza

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**TESTES DE ELISA E VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO NA DETECÇÃO DE
ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA NO
SORO E LEITE**

Elaborada por
Diego Artemio Franco Sturza

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM
(Presidente/orientador)

Charles Fernando Capinos Scherer, PhD, HIPRA

Rudi Weiblen, PhD, UFSM

Santa Maria, 02 de junho de 2011

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

TESTES DE ELISA E VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA NO SORO E LEITE

AUTOR: DIEGO ARTEMIO FRANCO STURZA

ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de junho de 2011

O sucesso nas estratégias de controle e erradicação do vírus da diarréia viral bovina (BVDV), passa pela identificação e eliminação dos animais persistentemente infectados (PI). Como esses animais excretam continuamente o vírus, a prevalência e os títulos de anticorpos nos rebanhos que os possuem são geralmente altos. Por isso, amostras de tanques coletivos de leite são frequentemente utilizadas na triagem de rebanhos. No presente trabalho, amostras coletivas de leite e amostras de soro foram submetidas a duas técnicas sorológicas, a fim de estabelecer a mais adequada para esta finalidade. Para tal, 767 amostras coletivas de leite e 701 amostras de soro bovino foram testadas com um kit ELISA indireto (teste padrão) e pela técnica de vírus-neutralização (VNT). Devido aos efeitos tóxicos do leite sobre o cultivo celular, a VNT foi adaptada, o que consistiu no aumento do volume final na etapa de incubação com os cultivos celulares. No teste do leite, foram positivas 177 e 139 amostras, no ELISA e na VNT, respectivamente. Com isso, a VNT adaptada apresentou uma sensibilidade (Se) de 76,8% e uma especificidade (Sp) 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 correlação moderada positiva ($r = 0,57$) com $p < 0,05$. No teste do soro, foram positivas 442 e 602 amostras no ELISA (teste padrão) e na VNT, respectivamente. Observou-se uma (Se) de 92,7% e (Sp) de 27,1%, com (k) de 0,23, demonstrando uma fraca concordância entre as duas técnicas. O coeficiente de correlação entre OD e os títulos de anticorpos demonstrou uma correlação moderada positiva ($r = 0,54$) com $p < 0,05$. Observaram-se nos testes do leite e do soro, várias amostras com títulos altos na VNT apresentando ODs baixas a medianas. Por outro lado, várias amostras com títulos neutralizantes baixos apresentaram ODs altas. Baseado nos resultados, e partindo do pressuposto que a presença de animais PI reflete-se em títulos neutralizantes geralmente ≥ 80 , conclui-se que a VNT é mais adequada para a realização de triagem em amostras coletivas de leite quando objetiva-se detectar rebanhos com altos títulos de anticorpos neutralizantes, possíveis portadores de animais PI.

Palavras-chave: Animais persistentemente infectados. BVDV. Diagnóstico.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PERFORMANCE OF VIRUS NEUTRALIZING TEST AND ELISA FOR DETECTION OF ANTIBODIES AND IDENTIFICATION OF HERDS WITH BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS INFECTION

AUTHOR: DIEGO ARTEMIO FRANCO STURZA

ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES

Date and Local Defence: Santa Maria, 02nd June, 2011

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, the prevalence and titers of antibodies in herds with PI animals are often high. Hence, bulk milk and serum samples were subjected to two serological tests in order to establish the most appropriate for herd screening. For this, 767 samples of bulk milk and 701 serum samples were analyzed by a commercial ELISA kit and by virus-neutralization test (VNT). The toxic effects of milk for cell cultures on VNT was abolished by increasing the final volume of medium during the incubation. Among the tested milk samples, 177 and 139 were positive in VNT and ELISA, respectively. Thus, the VNT showed a sensitivity (Se) of 76.8% and a specificity (Sp) of 99.5%. The Kappa index (k) was 0.82, demonstrating an excellent agreement between the two techniques. The analysis of the correlation coefficient between the absorbance values in ELISA (OD) and antibody titers in positive samples in VNT showed a moderate positivity ($r = 0.57$) with $p < 0.05$. In serum samples, 442 and 602 were positive in ELISA and VNT, respectively. This resulted in a VNT sensitivity (Se) of 92.7% and specificity (Sp) of 27.1%, with (k) of 0.23, reflecting a weak agreement between the two techniques. The correlation coefficient between OD and antibody titers showed a moderate positivity ($r = 0.54$) with $p < 0.05$. Testing of both milk and serum revealed a considerable number of samples with high VN titers and low ODs. On the other side, many samples with low VN titers showed high ODs in the ELISA. Based on the above mentioned results, and assuming that the presence of PI animals usually results in VN titers ≥ 80 , we conclude that the VNT is more appropriate to conduct herd screening in bulk milk when the objective is to detect herds with high titers of neutralizing antibodies, potentially harboring PI animals.

Keywords: Animals persistently infected. BVDV. Diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 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)..... 33
- Figura 2 – 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) em amostras de soro. Os valores no eixo x correspondem respectivamente aos títulos na VNT (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 e ≥ 320)..... 34

LISTA DE TABELAS (QUADROS)

CAPÍTULO 1

- 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..... 35
- 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..... 36
- Quadro 3 – Resultados dos testes de ELISA e vírus-neutralização (VN) para a detecção de anticorpos contra o BVDV em amostras de soro..... 37
- Quadro 4 – Distribuição dos títulos de anticorpos no teste de vírus-neutralização (VNT) e a respectiva densidade óptica (OD) das amostras de soro..... 38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 CAPÍTULO 1. Testes de ELISA e vírus-neutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro e leite.....	11
Abstract.....	12
Resumo.....	14
Introdução.....	16
Material e métodos.....	20
Resultados.....	23
Discussão.....	25
Conclusão.....	29
Referências.....	30
3 REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um membro do gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*. Este vírus possui envelope, diâmetro de 40 a 50 nm e contém como genoma uma molécula de RNA linear fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 12,5kb (DONIS, 1995). Os isolados do BVDV são agrupados em dois genótipos, BVDV-1 e BVDV-2, que são genética e antigenicamente distintos (RIDPATH et al., 1994; PELLERIN et al., 1994). Nos dois genótipos, são encontrados isolados não-citopáticos (NCP) – que representam a grande maioria das amostras circulantes – e citopáticos (CP), que são normalmente de casos de doença das mucosas (DUBOVI, 1992). A segregação em biótipos está baseada nas diferenças observadas em cultivo celular. Enquanto o BVDV (CP) induz vacuolização citoplasmática e morte celular, o BVDV (NCP) infecta as células sem causar efeitos aparentes (FULTON et al., 2005). O biótipo NCP é a fonte para o CP, o qual surge por mutações e/ou recombinações no gene da proteína não-estrutural NS23 (RIDPATH et al., 2006).

Do ponto de vista clínico, a infecção pelo BVDV é capaz de produzir um amplo espectro de manifestações, desde infecções inaparentes, que ocorrem na maioria dos casos, até à altamente fatal, doença das mucosas (BOLIN, 1990). Incluem-se nesse quadro clínico, manifestações respiratórias, doença gastroentérica, hemorrágica, lesões cutâneas, entre outras (BAKER, 1995). Em rebanhos onde o BVDV é endêmico, notadamente as perdas decorrem principalmente das formas respiratória e reprodutiva. A doença reprodutiva é devido à infecção direta do feto e suas manifestações dependem do biótipo do vírus, status imunológico da fêmea e do estágio da gestação no qual ocorreu a infecção (BROCK, 1995).

Durante a gestação, a infecção de fêmeas soronegativas com o biótipo NCP pode cursar com reabsorção embrionária, abortamentos, mumificações, malformações fetais e o nascimento de bezerros fracos (BAKER, 1995). Certamente quaisquer dessas manifestações causam perdas econômicas importantes. Contudo, a maior implicância causada pelo BVDV

sobre a reprodução, resulta da infecção entre 40 a 125 dias de gestação, com a produção de animais imunotolerantes e persistentemente infectados (PI). Os animais PI ao nascimento são positivos para vírus e não possuem anticorpos neutralizantes em níveis detectáveis (ARENHART et al., 2008). Com a ingestão de colostro, anticorpos neutralizantes podem ser detectados 30 dias após o nascimento, porém, os níveis gradativamente reduzem até os animais PI se tornarem soronegativos (ARENHART et al., 2009). Podem ser clinicamente normais, contudo, apresentam viremia contínua em níveis médios a altos, excretando continuamente o vírus em maiores títulos, principalmente nas secreções nasais e oculares (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995; ARENHART et al., 2009).

Apesar da alta mortalidade dos animais PI (HOUE, 1993) e das estimativas de prevalência alcançar um nível de 1-2%, são estimados que 60-90% de toda a população mundial de bovinos possuam anticorpos contra o BVDV (HOUE, 1999). Também se observa que, em rebanhos com a presença dos animais PI, > 90% dos animais são soropositivos e apresentam altos títulos de anticorpos (HOUE, 1995). Em um estudo realizado na Inglaterra e no País de Gales, o qual comparou sorologicamente a prevalência de anticorpos contra o BVDV, notou-se que esses permaneceram estáveis aos resultados obtidos em pesquisas realizadas há 10 e 20 anos atrás (PATON et al., 1998). Isso reflete a habilidade do vírus de permanecer endêmico na ausência de medidas de controle sistêmico, bem como, demonstra que a viremia e excreção viral contínua em altos títulos por animais PI assegura a disseminação rápida do vírus à animais mantidos em contato (ARENHART et al., 2009).

Por se constituírem na principal fonte de infecção para os animais susceptíveis, os animais PI são os alvos dos programas de controle e erradicação da infecção pelo BVDV (BITSCH & RØNSHOLT, 1995). Contudo, devido à baixa prevalência de animais PI na população bovina, inicialmente é recomendável se conhecer o status imunitário do rebanho e as características da resposta imunológica contra a infecção pelo BVDV.

A soroconversão em animais imunocompetentes ocorre entre uma a três semanas após a infecção aguda, sendo os anticorpos classificados em dois grupos funcionais. Anticorpos neutralizantes contra a glicoproteína E2 (gp53), principal indutora da resposta imune, a qual é responsável pela adsorção e fusão do vírus na célula e, anticorpos não-neutralizantes responsivos a proteína viral não-estrutural NS2-3 (p125), a qual é essencial para a replicação intracelular do vírus (HOWARD, 1990; COLLETT, 1992; BROCK, 1995). Baseado nesses principais sítios antigênicos da partícula viral, as provas sorológicas foram desenvolvidas e, com muito sucesso, estão sendo empregadas na rotina de diagnóstico laboratorial do BVDV (HOUE, LINDBERG & MOENNING, 2006).

Em vários países europeus, a detecção de anticorpos em tanques coletivos de leite (NISKANEN, 1993) e a detecção de anticorpos em amostras de soro individuais ou em *pool* de animais entre 9-18 meses (HOUE, 1992), utilizando o teste de vírus-neutralização (VNT) e o teste ELISA indireto possibilitam a classificação de rebanhos em potencialmente infectados e não-infectados (OIE, 2009). Os testes ELISA se tornaram populares no diagnóstico do BVDV, devido a algumas vantagens sobre a VNT, como: independem de cultivo celular; não há preocupação com contaminação fúngica ou bacteriana e, a leitura dos resultados é fácil e pode ser feita em poucas horas, a partir do soro e leite – por isso, podem ser aplicados facilmente em estudos epidemiológicos e em triagens de grandes populações (NISKANEN et al., 1989).

Contudo, quando a performance dos testes ELISA indireto é comparada com a VNT, somente usando as partículas víricas purificadas ou ELISA anti NS2-3, é possível alcançar resultados similares a VNT (MOENNIG et al., 1991). Também se observa que, a grande maioria dos testes ELISA disponíveis no mercado são qualitativos, o que teoricamente impossibilita qualquer estratificação dos valores de absorvância. Entretanto, várias triagens de rebanhos que utilizam leite de tanque coletivo ou soro individual ou de *pool*, empregam como único teste a técnica do ELISA (DIAS & SAMARA, 2003; MELÉNDEZ & DONOVAN, 2003; DIÉGUEZ et al., 2008; GAROUSSI et al., 2008; GUARINO et al., 2008).

Portanto, com base no exposto, e pela necessidade de se dispor de uma técnica sorológica adequada para a triagem de rebanhos com atividade viral – indicada por níveis altos de anticorpos, o presente trabalho teve como objetivos: (1) avaliar a performance dos testes de vírus-neutralização e ELISA na detecção de anticorpos anti-BVDV em amostras de leite coletivo e soro, e (2) investigar a correlação entre densidade óptica (OD) e títulos de anticorpos neutralizantes anti-BVDV no leite e no soro.

2 CAPÍTULO 1.

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

Diego Artemio Franco Sturza¹, Rudi Weiblen¹ & Eduardo Furtado Flores^{1*}

(Artigo a ser submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2011)

¹Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: E.F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, CEP 97105-900. Fone/fax + (55) 55 3220-8034. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

ABSTRACT – Sturza D., Weiblen R. & Flores E.F. 2010. [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 diarréia viral bovina no leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Rurais. 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, the prevalence and titers of antibodies in herds with PI animals are often high. Hence, bulk milk and serum samples were subjected to two serological tests in order to establish the most appropriate for herd screening. For this, 767 samples of bulk milk and 701 serum samples were analyzed by a commercial ELISA kit and by virus-neutralization test (VNT). The toxic effects of milk for cell cultures on VNT was abolished by increasing the final volume of medium during the incubation. Among the tested milk samples, 177 and 139 were positive in VNT and ELISA, respectively. Thus, the VNT showed a sensitivity (Se) of 76.8% and a specificity (Sp) of 99.5%. The Kappa index (k) was 0.82, demonstrating an excellent agreement between the two techniques. The analysis of the correlation coefficient between the absorbance values in ELISA (OD) and antibody titers in positive samples in VNT showed a moderate positivity ($r = 0.57$) with $p < 0.05$. In serum samples, 442 and 602 were positive in ELISA and VNT, respectively. This resulted in a VNT sensitivity (Se) of 92.7% and specificity (Sp) of 27.1%, with (k) of 0.23, reflecting a weak agreement between the two techniques. The correlation coefficient between OD and antibody titers showed a moderate positivity ($r = 0.54$) with $p < 0.05$. Testing of both milk and serum revealed a considerable number of samples with high VN titers and low ODs. On the other

side, many samples with low VN titers showed high ODs in the ELISA. Based on the above mentioned results, and assuming that the presence of PI animals usually results in VN titers \geq 80, we conclude that the VNT is more appropriate to conduct herd screening in bulk milk when the objective is to detect herds with high titers of neutralizing antibodies, potentially harboring PI animals.

INDEX TERMS: animals persistently infected, BVDV, diagnostic.

RESUMO - O sucesso na estratégia de controle e erradicação do vírus da diarreia viral bovina (BVDV), passa pela identificação e eliminação dos animais persistentemente infectados (PI). Como esses animais excretam continuamente o vírus, a prevalência e os títulos de anticorpos nos rebanhos são geralmente altos. Por isso, amostras de tanques coletivos de leite são frequentemente utilizadas na triagem de rebanhos. No presente trabalho, amostras coletivas de leite e soro foram submetidas a duas técnicas sorológicas, a fim de estabelecer a mais adequada para esta finalidade. Para tal, 767 amostras coletivas de leite e 701 amostras de soro bovino foram testadas com um kit ELISA indireto (teste padrão) e pela técnica de vírus neutralização (VNT). Devido aos efeitos tóxicos do leite sobre o cultivo celular, a VNT foi adaptada, o que consistiu no aumento do volume final na etapa de incubação celular. No teste do leite, foram positivas 177 e 139 amostras, no ELISA e na VNT, respectivamente. Com isso, a VNT adaptada apresentou uma sensibilidade (Se) de 76,8% e uma especificidade (Sp) 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 absorvância 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 teste do soro, foram positivas 442 e 602 amostras no ELISA (teste padrão) e na VNT, respectivamente. Observou-se uma (Se) de 92,7% e (Sp) de 27,1%, com (k) de 0,23, demonstrando uma fraca concordância entre as duas técnicas. O coeficiente de correlação entre OD e os títulos de anticorpos demonstrou uma positividade moderada ($r = 0,54$) com $p < 0,05$. Observaram-se nos testes do leite e do soro, várias amostras com títulos altos na VNT apresentando ODs baixas a medianas. Por outro lado, várias amostras com títulos neutralizantes baixos apresentaram ODs altas. Baseado nos resultados, e partindo do pressuposto que a presença de animais PI reflète-se por títulos neutralizantes geralmente ≥ 80 , conclui-se que a VNT é mais adequada para a

realização de triagem em amostras coletivas de leite quando objetiva-se detectar rebanhos com altos títulos de anticorpos neutralizantes, possíveis portadores de animais PI.

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

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea 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 & Tråvén 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 \geq 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) demonstrou 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 infecção 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). As duas primeiras opções, pela praticidade, baixo custo e pelo sucesso obtido nos programas de controle e erradicação do BVDV nos países escandinavos, apresentam os melhores valores de custo-benefício (Houe 1995, Valle 2005).

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, conseqüentemente o teste de todos os animais para a detecção e eliminação de animais PI (Larsson, Niskanen & Alenius 1994, Bitsch & Ronsholt 1995). Da mesma maneira, a aplicação dos títulos de anticorpos neutralizantes anti-BVDV obtidos a partir da triagem de apenas cinco animais

jovens, com pelo menos três destes possuindo altos títulos (≥ 128), possibilita a distinção de rebanhos com ou sem a presença de infecção viral (Houe 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, Grummer & Moening 2003) amparados principalmente nos resultados de Niskanen (1993), Houe et al. (1995), Paton et al. (1998) os quais avaliando kits ELISAs 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 (ex: pessoas treinadas em cultivo celular e virológico), 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 deste ser aplicado em 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, amostras de soro foram submetidas à análise pela VNT e pelo ELISA, avaliando-se também o desempenho dos testes. Após, procedeu-se a análise dos

índices de correlação entre títulos de anticorpos neutralizantes e os valores de densidade óptica (OD) oriundos das amostras de leite e soro. Por fim foi estabelecida a técnica sorológica que determina 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 e soro

Foram testadas 767 amostras de leite coletivas, obtidas no Centro de Pesquisa em Alimentação da Universidade de Passo Fundo (CEPA/UPF) e 701 amostras de soro bovino submetidas ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (SV/UFSM) para diagnóstico sorológico. As alíquotas de leite foram enviadas resfriadas, com adição do conservante Bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1, 3-diol). Para a realização dos testes sorológicos, as amostras de leite foram previamente centrifugadas a 3.000 rpm por 30min a 4°C. A fase aquosa foi coletada para os testes e em seguida conservada a -20°C até o uso. As amostras de soro foram submetidas a inativação a 56°C por 30 min.

Teste comercial ELISA

A pesquisa de anticorpos anti-BVDV nas amostras de leite coletivo e soro foi realizada por um kit ELISA indireto (HerdChek, Idexx, Maine, EUA). Os procedimentos foram conduzidos conforme as instruções do fabricante. Foram consideradas positivas as amostras de leite coletivo que apresentaram densidade óptica (OD) $\geq 0,2$. Para as amostras de soro, aquelas com densidade óptica (OD) $< 0,2$ são consideradas negativas; $\geq 0,2$ e $< 0,3$ são amostras suspeitas, e finalmente amostras com OD $\geq 0,3$ são positivas.

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 CO₂ a 37°C.

Teste de vírus-neutralização (VNT) adaptada – leite coletivo

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 200µL de MEM suplementada com 10% de soro equino, seguindo-se de incubação em estufa de CO₂ a 37°C. A leitura dos testes foi realizada após 96h de incubação, pelo monitoramento do efeito citopático (ECP).

Teste de vírus-neutralização (VNT) - soro

Para a análise dos títulos de anticorpos, foram empregadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando-se diluições crescentes na base 2 do soro (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280; 1:2560; 1:5120 1:10240) frente à 100 DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares/cavidade) da cepa de BVDV citopática Singer. Após incubação da mistura soro-vírus por 2h a 37°C, foi adicionada uma suspensão de células MDBK em 50µL de MEM suplementada com 10% de soro equino, seguindo-se de incubação em estufa de CO₂ 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 (leite coletivo) e da VNT (soro) foi calculada em relação ao teste ELISA indireto, e o grau de concordância entre os testes foi estimada pelo índice kappa (k). As amostras de soro que tiveram valores de densidade óptica, consideradas suspeitas (OD $\geq 0,2$ e $< 0,3$) não foram contabilizadas nos cálculos supra mencionados. 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, 160 e > 320) foram substituídos respectivamente por (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). Ambas as regressões, 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 μ L, 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 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 2). 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%.

Desempenho do teste de vírus neutralização e do ELISA no soro

Em relação ao soro, os resultados de ambos os testes estão representados nos Quadros 3 e 4. Observa-se que o teste ELISA detectou 63,1% (442/701) amostras positivas com $OD \geq 0,3$; 6,4% (45/701) amostras suspeitas com $OD \geq 0,2$ e $< 0,3$ e 30,5% (214/701) amostras negativas. Já na VNT, foram positivas 85,9% (602/701), ou seja, apresentaram títulos anti-BVDV ≥ 5 . Pode-se observar que os dois testes produziram resultados equivalentes em 58,5% (410/701) das amostras. Para os cálculos de desempenho dos testes (Quadro 3), as amostras suspeitas no ELISA (45/701 – 6,4%), não foram incluídas no cálculo. Com isso, a VNT apresentou sensibilidade de 92,7%; especificidade de 27,1%; valor preditivo positivo de 72,4%; valor preditivo negativo de 64,4% com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) em relação ao kit ELISA indireto. O índice de concordância Kappa (k) entre os testes foi de 0,23, indicando uma fraca correlação entre as técnicas (Landis & Koch 1977). Na Figura 2, observa-se uma correlação moderada positiva ($r = 0,54$) entre os dois testes (Plackett 1983), com uma confiabilidade de 95%.

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). Na evolução viral, talvez essa variabilidade faça parte de uma das estratégias do vírus de evadir-se dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelo hospedeiro (Donis 1995).

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 observado 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.

Desempenho da VNT e do ELISA no soro

Os valores obtidos na análise de soro por ambos os testes, corroboram resultados de Moenning et al. (1991), o qual afirmam que a performance dos testes ELISA indireto quando comparada com a VNT, somente alcança resultados similares quando do uso de partículas víricas purificadas ou ELISA anti NS2-3. Essas diferenças podem ser evidenciadas observando os valores encontrados no Quadro 4. Percebe-se que o ELISA considerou 30,5% (214/701) das amostras como negativas. Essas amostras ao serem quantificadas pela VNT, apenas 27,1% (58/214) realmente não apresentaram títulos de anticorpos anti-BVDV. De maneira mais contundente, 9,8% (21/214) dessas amostras possuíam anticorpos ≥ 80 , considerados valores moderados a altos. Em rebanhos expostos aos animais PI, esses valores de títulos indicam a presença desses animais (Houe et al. 1995). Por outro lado, 35,5% (157/442) das amostras que possuem baixos títulos (≤ 40) e que possivelmente são oriundos de rebanhos sem atividade viral, poderiam ser alvos da etapa seguinte do programa de identificação e eliminação dos animais PI. Outra observação possível demonstra que o ELISA apresenta deficiência em detectar amostras com títulos ≤ 40 . Esses resultados, quando categorizados como positivos, também podem conduzir a uma pesquisa de animais persistentemente infectados. Conforme as informações acima, várias amostras que sugerem a presença de animais PI no rebanho não foram consideradas positivas no ELISA, enquanto amostras com baixos títulos, que dificilmente fazem parte de um rebanho com uma infecção ativa, foram consideradas positivas no ELISA.

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 & Moenning (2006) demonstram que é necessário proceder à coleta de sangue de

todos os animais da propriedade com idade superior a três meses e inferior à dois anos, para posterior detecção pelo isolamento viral (Edwards 1990). Para ser excluída a probabilidade de uma infecção aguda, caso um animal seja positivo neste teste, é necessário um reteste entre 3-4 semanas após a primeira coleta. Do ponto de vista epidemiológico e econômico, deve-se considerar ainda: (1) a maioria das infecções causadas pelo BVDV são subclínicas, e por isso, de difícil diagnóstico e mensuração das possíveis 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 aumentando 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 na grande maioria dos países que implantaram essa medida (Houe, Lindberg & Moenning 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 nos rebanhos.

CONCLUSÃO

Em resumo, 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, quando objetiva-se detectar rebanhos com títulos de anticorpos que indiquem atividade viral.

REFERÊNCIAS

- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. North Am.* 11:425-446.
- Beauudeau F., Belloc C., Seegers H., Assié S., Sellal 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 Diarréia 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 diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25:125-134.
- Gunn G.J., Saatkamp H.W., R.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. & Moenning V. 2003. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biol.* 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., Rønsholt 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.
- Magar R., Minocha H.C., Montpetit C., Carman P.S. & Lecomte J. 1988. Typing of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus reference and Canadian field strains using a neutralizing monoclonal antibody. *Can. J. Vet. Res.* 52:42-45.
- Moennig V., Leder L., Greiser-Wilke I., Frey H.R., Liess B., 1991. Ein neuer Enzymimmuntest zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der bovinen Virusdiarrhoe. *Tieraerztl. Prax.* 19:35-38.
- 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. J.* 163:251-259.
- Oliveira E.A.S. 1996. Caracterização antigênica de amostras de vírus da diarréia 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. *Biol.* 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. 2000. 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.
- Valle P.S., Skjerve E., Martin S.W., Larssen R.B., Østerås O. & Nyberg O. 2005. *Prev. Vet. Med.* 72:189-207.
- Vilcek S. & Nettleton P.F. 2006. Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol.* 116:1-12.

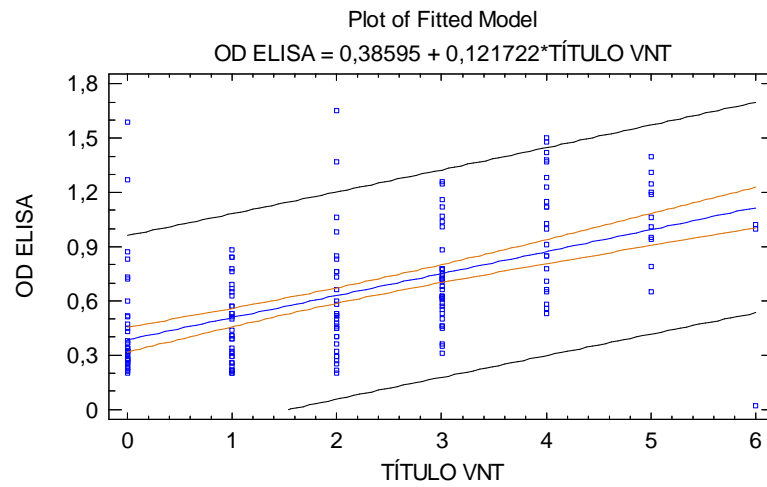


Figura 1. Correlação linear simples entre os valores de densidade óptica (OD) no ensaio imunoenzimático do tipo ELISA e os títulos de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no teste de vírus-neutralização (VNT) adaptada a amostras de leite coletivo. Os valores no eixo x correspondem respectivamente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

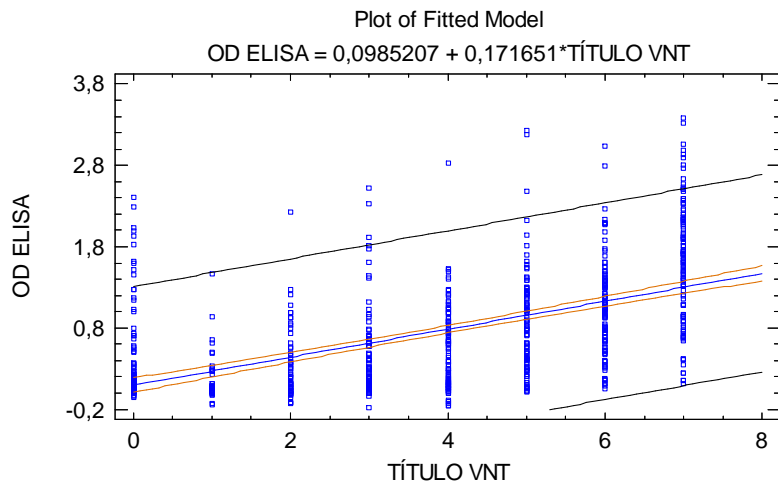


Figura 2. Correlação linear simples entre os valores de densidade óptica (OD) no ensaio imunoenzimático do tipo ELISA e os títulos de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no teste de vírus-neutralização (VNT) em amostras de soro. Os valores no eixo x correspondem respectivamente aos títulos na VNT (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 e ≥ 320).

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	ELISA		
	Positivos (%)	Negativos (%)	TOTAL (%)
Positivos	136 ^a (17,7)	3 ^b (0,4)	139 ^{a+b} (23,1)
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: $(a) / (a+c) \times 100 = 136/177 \times 100 = 76,8\%$

Especificidade relativa: $(d) / (b+d) \times 100 = 587/590 \times 100 = 99,5\%$

Valor preditivo positivo: $(a) / (a+b) \times 100 = 136/139 \times 100 = 97,9\%$

Valor preditivo negativo: $(d) / (c+d) \times 100 = 587/590 \times 100 = 99,5\%$

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

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	
0	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

Quadro 3 – Resultados dos testes de ELISA e vírus-neutralização (VN) para a detecção de anticorpos contra o BVDV em amostras de soro

VÍRUS NEUTRALIZAÇÃO	ELISA		TOTAL (%)
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Positivos	410 ^a (62,5)	156 ^b (23,8)	566 ^{a+b} (86,3)
Negativos	32 ^c (4,9)	58 ^d (8,8)	90 ^{c+d} (13,1)
Total	442 ^{a+c} (67,4)	214 ^{b+d} (32,6)	656 ^{a+b+c+d} (100)

Sensibilidade relativa: $(a) / (a+c) \times 100 = 410/442 \times 100 = 92,7\%$

Especificidade relativa: $(d) / (b+d) \times 100 = 58/214 \times 100 = 27,1\%$

Valor preditivo positivo: $(a) / (a+b) \times 100 = 410/566 \times 100 = 72,4\%$

Valor preditivo negativo: $(d) / (c+d) \times 100 = 58/90 \times 100 = 64,4\%$

Kappa = Precisão observada (PO) – precisão esperada (PE)/1 – PE = 0,09/0,38 = 0,23

Quadro 4 – Distribuição dos títulos de anticorpos no teste de vírus-neutralização (VNT) e a respectiva densidade óptica (OD) das amostras de soro

VNT título	ELISA (OD)			Total (%)
	<0,2 (%) ¹	≥0,2 e <0,3 (%) ²	≥0,3 (%) ³	
0	58 (58,6)	9 (9,1)	32 (32,3)	99 (100)
5	27 (69,2)	5 (12,8)	7 (17,9)	39 (100)
10	31 (52,5)	3 (5,1)	25 (42,4)	59 (100)
20	41 (47,1)	10 (11,5)	36 (41,4)	87 (100)
40	36 (35,3)	9 (8,8)	57 (55,9)	102 (100)
80	11 (11,8)	7 (7,5)	75 (80,6)	93 (100)
160	7 (6,5)	1 (0,9)	99 (92,5)	107 (100)
>320	3 (2,6)	1 (0,9)	111 (96,5)	115 (100)
Total	214 (30,5)	45 (6,4)	442 (63,1)	701 (100)

¹ Amostras negativas, ² amostras suspeitas e ³ amostras positivas no ELISA

3 REFERÊNCIAS

ARENHART, S. et al. Proteção fetal contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em vacas prenhes previamente imunizadas com uma vacina experimental atenuada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.461-470, 2008.

ARENHART, S. et al. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.736-742, 2009.

BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, p.425-446, 1995.

BITSCH, V.; RONSHOLT, L. Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p.627-640, 1995.

BOLIN, S.R. The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. **Veterinary Medicine**, v.85, p.1123-1132, 1990.

BROCK, K.V. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, p.549-561, 1995.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhea virus infections. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, p.43-59, 1990.

COLLETT, M.S. Molecular genetics of pestiviruses. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, p.145-154, 1992.

DIAS, F.C.; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.161-168, 2003.

DIÉGUEZ, F.J. et al. Monitoring bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection status in dairy herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.588-592, 2008.

DONIS, R. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, p.393-421, 1995.

DUBOVI, E.J. Genetic diversity and BVDV virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, p.155-165, 1992.

FULTON, R.W. et al. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV-1a, 1b, and 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.35-40, 2005.

GAROUSI, M.T. et al. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bulk tank milk of industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran. **Preventive Veterinary Medicine**, v.84, p.171-176, 2008.

GUARINO, H. et al. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v.85, p.34-40, 2008.

HOUE, H. Age distribution of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus in twenty-two Danish dairy herds. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.56, p.194-198, 1992.

HOUE, H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). **Preventive Veterinary Medicine**, v.15, p.275-283, 1993.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, p.521-548, 1995.

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

HOUE, H.; LINDBERG, A. & MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.427-436, 2006.

HOWARD, C.J. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, p.95-103, 1990.

MELÉNDEZ, P.; DONOVAN, A. Herd-level ELISA seroprevalence of bovine viral diarrhoea antibodies in bulk-tank milk in Chilean dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.60, p.237-241, 2003.

MOENNIG, V. et al. Ein neuer Enzymimmunttest zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der bovinen Virusdiarrhoe. **Tierärztliche Praxis**, v.19, p.35-38, 1991.

NISKANEN, R. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.36, p.113-118, 1989.

NISKANEN, R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. **Veterinary Record**, v.133, p.341-344, 1993.

OIE. Office International des Epizooties. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, v.2, p.698-711, 2009.

PATON, D.J. et al. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **Veterinary Record**, v.4, p.385-391, 1998.

PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v.203, p.260-267, 1994.

RIDPATH, J. et al. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v.205, p.66-74, 1994.

RIDPATH, J.F. et al. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.196-204, 2006.