



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS-PB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ANA LUISA ALVES MARQUES

**DIARREIA VIRAL BOVINA NO SEMIÁRIDO PARAIBANO: ESTUDOS
RETROSPECTIVO, SOROLÓGICO E DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL.**

JUNHO - 2016

PATOS-PB

ANA LUISA ALVES MARQUES

**DIARREIA VIRAL BOVINA NO SEMIÁRIDO PARAIBANO: ESTUDOS
RETROSPECTIVO, SOROLÓGICO E DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

PATOS-PB

JUNHO-2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

M357d Marques, Ana Luisa Alves.

Diarréia viral bovina no semiarido paraibano: estudo retrospectivo, sorológico e de identificação viral / Ana Luisa Alves Marques. – Patos, 2016.

84f.:il.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

“Orientação: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo”.

Referências.

1. Sistema Digestivo. 2. Doenças Virais. 3. Epidemiologia. 4. Bovino. 5. BVDV-3. I. Título.

CDU 614.9

ANA LUISA ALVES MARQUES

**DIARREIA VIRAL BOVINA NO SEMIÁRIDO PARAIBANO: ESTUDOS
RETROSPECTIVO, SOROLÓGICO E DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária da Universidade Federal
de Campina Grande como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária

Aprovada em: 03 /06/2016

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo- Orientador
Universidade Federal de Campina Grande – Campus de Patos-PB
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária**

**Prof^a. Dra. Tatiane Rodrigues da Silva
Faculdade Pio Decimo – Campus III-SE
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária**

**Prof^a. Dr^a. Gildeni Maria Nascimento de Aguiar
Universidade Federal de Alagoas-Campus Arapiraca-AL
Unidade Educacional de Viçosa**

**Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino
Universidade Federal de Campina Grande- Campus de Patos- PB
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária**

**Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes
Universidade Federal de Campina Grande- Campus de Patos- PB
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária**

*“Senhor Jesus!
Nós te agradecemos:
Pela coragem de facear as dificuldades criadas por nós mesmos;
Pelas provas que nos aperfeiçoam o raciocínio e nos abrandam o coração;
Pela fé na imortalidade;
Pelo privilégio de servir;
Pelo dom de saber que somos responsáveis pelas próprias ações;
Pelos recursos nutrientes e curativos que trazemos em nós próprios;
Pelo conforto de reconhecer que a nossa felicidade tem o tamanho da felicidade que fizemos
para os outros;
Pelo discernimento que nos permite diferenciar
aquilo que nos é útil daquilo que não nos serve;
Pelo amparo da afeição no qual as nossas vidas se alimentam em permuta constante;
Pela bênção da oração que nos faculta apoio interior para a necessária solução de nossos
problemas;
Pela tranquilidade de consciência que ninguém consegue subtrair-nos...
Por tudo isso, e por todos os demais tesouros, de esperança e de amor, de alegria e de paz, de
que nos enriqueces a existência, Sê bendito, Senhor!... ao mesmo tempo que te louvamos a
Infinita Misericórdia, hoje e para sempre.”*

(Emmanuel - Chico Xavier)

RESUMO

Objetivou-se realizar estudos clínico-patológicos e epidemiológicos das doenças digestivas em bovinos no Semiárido da Paraíba, com ênfase na diarreia viral bovina. Inicialmente realizou-se levantamento das doenças digestivas para a obtenção de informações sobre a ocorrência, aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos em bovinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014. Observou-se que a taxa de letalidade das enfermidades foi 51,9% (121/233). As reticulites traumáticas e a indigestão vaginal foram distúrbios motores frequentes e de alta letalidade; as interrupções do fluxo da ingesta ocasionadas por obstruções esofágicas, impactações no rúmen, omaso, abomaso e principalmente acidentes intestinais foram também enfermidades prevalentes, superando as afecções do abomaso e os distúrbios fermentativos da cavidade ruminoreticular. Actinobacilose, actinomicose e paratuberculose foram as doenças infecciosas bacterianas diagnosticadas, sendo a actinobacilose a mais frequente. As doenças infecciosas virais diagnosticadas foram febre catarral maligna, diarreia viral bovina (BVD) e a doença das mucosas. Um caso de diarreia viral bovina foi atendido no Hospital Veterinário e foram relatados seus aspectos clínicos e anatomopatológicos, além da identificação do vírus 'Hobi'-like (BVDV-3), um pestivirus atípico. Devido à identificação do BVDV-3, foi realizado um estudo soropidemiológico em 359 bovinos procedentes de 20 propriedades rurais do semiárido paraibano, sendo três propriedades com histórico de suspeita clínica de BVD ou doença das mucosas (DM) e 17 sorteadas aleatoriamente. Das 20 propriedades analisadas, em 19 (95%) havia animais soropositivos e a frequência de soropositividade por propriedade variou de 4,5% a 85,7%. Os fatores de risco identificados foram: área de até 120 ha ($OR = 3,06$; $IC\ 95\% = 1,43 - 6,53$), alta densidade de animais ($OR = 3,48$; $IC\ 95\% = 1,24 - 9,79$), idade ao desmame até 60 dias ($OR = 10,99$; $IC\ 95\% = 1,31 - 91,9$), permuta de animais ($OR = 4,95$; $IC\ 95\% = 2,08 - 11,8$), mortalidade de bezerros $> 5\%$ ($OR = 2,33$; $IC\ 95\% = 1,07 - 5,11$) e utilização de monta natural + inseminação artificial ($OR = 3,06$; $IC\ 95\% = 1,22 - 7,67$). Conclui-se que as doenças digestivas têm grande importância na clínica de bovinos e que o BVDV está presente no Estado da Paraíba, sugerindo que para evitar a difusão da infecção pelo BVDV em rebanhos bovinos do Sertão paraibano é importante a correção dos fatores de risco identificados, bem como é necessário conduzir estudos para a identificação de animais persistentemente infectados.

Palavras-chave: sistema digestivo, doenças virais, epidemiologia, bovino, BVDV-3, pestivirus

ABSTRACT

This study intended to achieve clinicopathological and epidemiological studies on digestive diseases in cattle in the Semiarid region in Paraíba, with emphasis on bovine viral diarrhoea. It performed initially a survey of digestive diseases to get information on the occurrence, clinicopathological and epidemiological aspects in cattle treated at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande, from January 2000 to December 2014. It was observed that the disease mortality rate was 51.9% (121/233). Traumatic reticulitis and vagal indigestion disorders were common engines and it had a high lethality; the interruptions of the flow of intake caused by esophageal obstruction, impaction in the rumen, omasum, abomasum and mainly intestinal accidents were also prevalent diseases, overcoming the abomasal disorders and fermentative disorders of the ruminoreticular cavity. Actinobacillosis, actinomycosis and paratuberculosis were the bacterial infectious diseases diagnosed and the Actinobacillosis is the most frequent. The viral infectious diseases were diagnosed malignant catarrhal fever, bovine viral diarrhoea (BVD) and mucosal disease. A case of bovine viral diarrhoea was treated at the Veterinary Hospital and were reported clinicopathological aspects, besides the identification of the virus' Hobi'-like (BVDV-3), an atypical pestivirus. Due to the identification of BVDV-3, it was performed a seroepidemiological study in 359 cattle coming from 20 farms in Semiarid of Paraíba, with three properties with a historical BVD and mucosal disease (MD) and 17 randomly selected. In the 20 properties analyzed, 19 (95%) were seropositive animals and the frequency of seropositivity for property varied from 4.5% to 85.7%. The risk factors identified were: area until 120 ha ($OR = 3.06$; 95% $CI = 1.43$ to 6.53), high density of animals ($OR = 3.48$; 95% $CI = 1.24 - 9.79$), age at weaning until 60 days ($OR = 10.99$, 95% $CI = 1.31$ to 91.9), exchange of animals ($OR = 4.95$; 95% $CI = 2.08 - 11.8$), mortality of calves $> 5\%$ ($OR = 2.33$; 95% $CI = 1.07$ to 5.11) and using natural breeding + artificial insemination ($OR = 3.06$; 95% $CI = 1, 22-7.67$). It is concluded that digestive diseases has a huge importance in the clinic for cattles and BVDV is present in the state of Paraíba, suggesting that to prevent the spread of BVDV infection in the outback of Paraíba is important to correct the identified risk factors and as well as it is necessary to conduct studies for the identification of persistently infected animals.

Keywords: digestive system, viral diseases, epidemiology, bovine, BVDV-3, pestivirus

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPITULO I

pág.

Tabela 1 – Análise univariada com as variáveis mais associadas ($P \leq 0,20$) à soropositividade para BVDV em bovinos do semiárido paraibano30

Tabela 2 – Fatores de risco, estimados por regressão logística múltipla, associados à soropositividade para BVDV em bovinos do semiárido paraibano32

CAPITULO III

Quadro I – Grupos de enfermidades digestivas diagnosticadas em bovinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande no período de janeiro de 2000 a dezembro de 201473

Quadro II – Afecções digestivas diagnosticadas em bovinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Patos – Paraíba no período de janeiro de 2000 a dezembro de 201473

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I	pág.
Figura 1 - Mapa do Estado da Paraíba demonstrando os municípios utilizados no estudo da sorologia para diarreia viral bovina e a frequência dos animais soropositivos	29
CAPITULO II	
Figura 1 - Bovino fêmea, 3 meses de idade, positivo para BVDV-3.(A). Espessamento difuso e acentuado da superfície dorsal da língua por material branco amarelado, friável e granular. (B). Observa-se no epitélio superficial da língua degeneração balonosa e formação de vesículas e pústulas. HE, barra = 50 µm	49
Figura 2 - Árvore filogenética retangular baseada nos fragmentos parciais das sequências de nucleotídeos do gene 5'NCR de membros do gênero <i>Pestivirus</i> .A amostra PB22487/12 está destacada com um símbolo (●)	50

Sumário

INTRODUÇÃO	9
Referências	10
CAPITULO I: Fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no semiárido do estado da Paraíba, região nordeste do Brasil.....	11
Resumo	12
Abstract.	12
Introdução.....	13
Material e Métodos.....	14
Resultados e Discussão	16
Conclusão	20
Referências	20
CAPÍTULO II: Detecção do vírus ‘HoBi’-like (BVDV-3) em bovino no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.....	29
Abstract.	30
Resumo.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	31
Resultados	33
Discussão.....	33
Conclusão	35
Referências	35
CAPÍTULO III : Enfermidades digestivas de bovinos da região semiárida do Brasil.	40
Introdução.....	42
Material e métodos	42
Resultados e discussão	42
Conclusão	49
Referências	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
ANEXOS	56

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (MAPA, 2016), sendo a pecuária uma das atividades do agronegócio mais importantes no semiárido, com condições de representar o eixo principal dos sistemas de produção nesta região, mesmo diante das dificuldades encontradas (Brito et al., 2009). Apesar da estiagem enfrentada na região desde 2013, a Paraíba registrou o maior crescimento entre os Estados do Nordeste do efetivo bovino no período de 2013 e 2014, com aumento de 9,25%, passando de 1,048 milhão de cabeças para 1,145 milhão (Paraíba, 2015).

Diante da importância da produção bovina para o semiárido, algumas afecções merecem destaque na criação. Os distúrbios digestivos, por exemplo, são uma das causas mais importantes de afecções em bovinos, e na sua maioria estão relacionados ao manejo nutricional inadequado. O fornecimento da alimentação correta de acordo com as diferentes categorias não é apenas uma exigência para manutenção de animais saudáveis, mas pré-requisito para a criação produtiva de bovinos, cujo principal objetivo é a busca pela melhoria na expressão do seu potencial genético. Dependendo do alimento ofertado, altera-se a população de microrganismos, taxa de passagem do alimento, motilidade e velocidade de absorção dos nutrientes, o que pode causar uma série de distúrbios digestivos e metabólicos que acarretam em perda de eficiência e produção, e conseqüentemente, prejuízos econômicos para os produtores (Van Cleef et al., 2009).

Em relação às doenças infecciosas associadas ao sistema digestivo, a diarreia viral bovina (BVD) tem surgido nos últimos anos no semiárido da Paraíba, em forma de surto e de casos isolados que estão sendo atendidos com maior frequência na rotina da clínica buiátrica do Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), tornando-a importante enquanto doença infecciosa com sinais digestivos.

O vírus da diarreia viral bovina (BVD) pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (ICTV, 2000), é um agente infeccioso de distribuição mundial, responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária bovina em todo o mundo. Apesar de sua terminologia estar associada à diarreia, a infecção com o BVDV pode se manifestar também como doença respiratória, gastroentérica, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, abortos, infertilidade temporária, defeitos congênitos, imunodepressão e doença das mucosas (Grooms et al., 2002). Os casos fatais geralmente estão relacionados à doença das mucosas, uma síndrome que acomete bovinos jovens com imunotolerância específica ao BVDV, os

denominados animais persistentemente infectados (PI), considerados a principal fonte de disseminação do vírus dentro do rebanho (Houe, 2003; Grooms, 2004).

Considerando a importância do estudo das doenças digestivas e da divulgação das informações acerca do diagnóstico dessas enfermidades já existentes e das emergentes, propôs-se a realização desta tese para que fosse realizado no Capítulo I o estudo dos fatores de risco associados à infecção pelo BVDV no semiárido do Estado da Paraíba, no Capítulo II o relato dos aspectos clínicos e histopatológicos, isolamento e identificação viralem um bezerro acometido pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tipo 3, e no Capítulo III um levantamento das afecções digestivas que acometeram bovinos atendidos no HV/UFCG.

Referências

- Grooms D.L., BAKER J.C., AMES T.R. 2002. Diseases caused by bovine virus diarrhea virus, p.707-714. In: Smith B.P. (ed.), Large Animal Internal Medicine: diseases of horses, cattle, sheep, and goats. 3rd ed. Mosby, St Louis, MO.
- Grooms D.L. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *VetClin Food Anim* 20:5-19.
- Houe H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*. 31: 137-143.
- ICTV. 2000. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Acesso dia 03/05/2016 <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>
- Paraíba, Governo do Estado. Acessado em 03/05/2016. <http://paraiba.pb.gov.br/paraiba-registra-maior-crescimento-de-rebanho-bovino-do-nordeste-revela-ibge/>
- Van Cleef, H.E.; Patiño, P.R.; Neiva Jr., P.A.; Serafim, S.R.; Rego, C.A.; Gonçalves, S.J. 2009. Distúrbios metabólicos por manejo alimentar inadequado em ruminantes: novos conceitos. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 1(2).

CAPITULO I

Fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no semiárido do estado da Paraíba, região nordeste do Brasil.

Trabalho aceito para publicação no periódico Semina: Ciências Agrárias

(Qualis B1)

Fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Semiárido do Estado da Paraíba, Região Nordeste do Brasil

Risk factors associated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in the semiarid of Paraíba, northeast region of Brazil

Ana Luisa Alves Marques¹; Adriana Cunha de Oliveira Assis²; Sara Vilar Dantas Simões³;
Mikael Leandro Duarte de Lima Tolentino⁴; Sérgio Santos de Azevedo^{3*}

Resumo O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tem emergido como um dos mais importantes agentes virais infecciosos em bovinos, sendo considerado endêmico em várias regiões. Objetivou-se com este estudo determinar a situação epidemiológica da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em rebanhos bovinos do semiárido paraibano, nordeste do Brasil, pela determinação da frequência de anticorpos anti-BVDV e de fatores de risco associados à infecção. Foram utilizadas 359 vacas de 20 propriedades rurais, sendo três propriedades com histórico de suspeita clínica de diarreia viral bovina (BVD) ou doença das mucosas (DM) e 17 sorteadas aleatoriamente. A detecção de anticorpos anti-BVDV foi realizada com *kit* comercial ELISA indireto (IDEXX BVDV p80 Ab *Test*) e a análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Sete amostras foram consideradas suspeitas e foram excluídas do cálculo da frequência de animais soropositivos. Dos 352 animais, 141 (40,1%; IC 95% = 34,9% - 45,2%) foram soropositivos. Das 20 propriedades analisadas, em 19 (95%) havia animais soropositivos e a frequência de soropositividade por propriedade variou de 4,5% a 85,7%. Os fatores de risco identificados foram: área de até 120 ha ($OR = 3,06$; IC 95% = 1,43 - 6,53), alta densidade de animais ($OR = 3,48$; IC 95% = 1,24 - 9,79), idade ao desmame até 60 dias ($OR = 10,99$; IC 95% = 1,31 - 91,9), permuta de animais ($OR = 4,95$; IC 95% = 2,08 - 11,8), mortalidade de bezerras > 5% ($OR = 2,33$; IC 95% = 1,07 - 5,11) e utilização de monta natural + inseminação artificial ($OR = 3,06$; IC 95% = 1,22 - 7,67). Sugere-se que para evitar a difusão da infecção pelo BVDV em rebanhos bovinos do sertão paraibano é importante a correção dos fatores de risco identificados, bem como é necessário conduzir estudos para a identificação de animais persistentemente infectados.

Palavras-chave: BVD, controle, doenças virais, epidemiologia.

Abstract The bovine viral diarrhea virus (BVDV) has emerged as one of the most important infectious viral agents in cattle, being considered endemic in many regions. The objective of this study was to determine the epidemiological situation of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds in the semiarid of the Paraíba State, Northeastern Brazil, by determining the frequency of anti-BVDV antibodies and the risk factors associated with the infection. It was used 359 cows from 20 herds, being three herds with a history of clinical suspicion of bovine viral diarrhea (BVD) or mucosal disease (MD) and 17 randomly selected. The detection of anti-BVDV antibodies was performed using a commercial ELISA kit (IDEXX BVDV p80 Ab Test) and the analysis of risk factors was carried out in two steps:

univariate and multivariate analyses. Seven samples were suspected and then were excluded from the calculation of the frequency of seropositive animals. Of the 352 animals, 141 (40.1%; 95% CI = 34.9% - 45.2%) were seropositive. Of the 20 herds analyzed in 19 (95%) there were seropositive animals and the frequency of seropositivity by herd ranged from 4.5% to 85.7%. Risk factors identified were: area of up to 120 ha (OR = 3.06; 95% CI = 1.43 – 6.53), high animal density (OR = 3.48; 95% CI = 1.24 – 9.79), age at weaning up to 60 days (OR = 10.99; 95% CI = 1.31 – 91.9), exchange animals (OR = 4.95; 95% CI = 2.08 – 11.8), calf mortality > 5% (OR = 2.33; 95% CI = 1.07 – 5.11) and the use of natural mating + artificial insemination (OR = 3.06; 95% CI = 1.22 – 7.67). It is suggested that the correction of the risk factors identified is important to avoid the BVDV spread in cattle herds in the semiarid of the Paraíba State, as well as it is need to conduct studies to identify the persistently infected animals.

Key-words: BVD, control, viral diseases, epidemiology.

Introdução

O caráter disseminador das infecções virais é uma preocupação constante entre veterinários e produtores, e talvez os pestivírus sejam os mais bem sucedidos de todos os vírus que acometem bovinos (SANDVIK, 1999). Nesse contexto, o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tem emergido como um dos mais importantes agentes virais infecciosos em bovinos, sendo considerado endêmico em várias regiões (BACHOFEN et al., 2013). Acredita-se que o impacto econômico da infecção seja inestimável, resultado de prejuízos súbitos devido à subfertilidade e imunodepressão que causa nos animais acometidos (RODNING et al., 2012).

A diarreia viral bovina (BVD) é causada por um RNA-vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, e pode manifestar-se como doença respiratória, gastroentérica, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, abortamentos, infertilidade temporária, defeitos congênitos, imunodepressão e doença das mucosas (DM) (GROOMS; KEILEN, 2002). No entanto, os problemas reprodutivos são considerados os mais importantes, pois o tropismo por células germinativas e a atividade do vírus no tecido ovariano causa falhas ou atraso na ovulação de fêmeas durante o estro, que podem apresentar baixas taxas de fertilização. Fêmeas prenhes, quando infectadas no início da gestação, podem apresentar perda embrionária ou fetal (abortamento e/ou mumificação), e quando infectadas entre 40 e 125 dias de gestação podem gerar animais persistentemente infectados (PI), que são os principais responsáveis pela manutenção do vírus nos rebanhos (BROWNLIE, 2002; GROOMS, 2004).

O vírus também apresenta tropismo por células linfoides, causando efeitos imunossupressores consequentes da depleção de linfócitos T e B, além de interferir na ação de macrófagos, o que favorece a ocorrência de infecções secundárias (BROWNLIE, 2002; RADOSTITS et al., 2002).

As técnicas mais comumente utilizadas para a detecção de anticorpos contra o BVDV são a virusneutralização (VNT) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). A VNT é adequada para a quantificação de anticorpos por titulação, e por ser um teste laborioso e caro, como alternativa, tem-se utilizado, na Europa, o ELISA, que tem se mostrado um método mais rápido e barato, podendo ser utilizado em amostras individuais ou *pools* de soro e/ou leite, principalmente em rebanhos não vacinados (HOUE et al., 2006; PRESI; HEIM, 2010; ROSSMANITH et al., 2010; STAHL; ALENIUS, 2012; BOOTH et al., 2013).

O primeiro estudo epidemiológico para BVDV na Paraíba ocorreu em 2006, a partir de um levantamento sorológico em 2.343 animais provenientes de 18 propriedades (THOMPSON et al., 2006). Na ocasião, encontrou-se uma prevalência de animais soropositivos de 22,2%, distribuídos em 88,9% das propriedades amostradas. No entanto, não foi realizado estudo de fatores de risco. A identificação de fatores de risco associados à infecção por BVDV assume relevância na medida em que os indicadores obtidos servem para nortear o planejamento de medidas de prevenção e controle, o que tem implicação direta na redução da disseminação da infecção e na minimização de perdas econômicas.

Na Paraíba, nos últimos anos, animais com sinais clínicos sugestivos de DM foram atendidos no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), localizada em Patos, e recentemente foi isolado o BVDV em um surto no município de Pombal (WEBER et al., 2014). Desta maneira, considerando que o vírus foi confirmado em rebanhos paraibanos, há necessidade de se conhecer a situação epidemiológica da infecção, uma vez que o Estado não tem histórico de vacinação contra o BVDV.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a situação epidemiológica da infecção por BVDV em rebanhos bovinos do Semiárido paraibano pela determinação da frequência de anticorpos anti-BVDV e identificação dos fatores de risco associados à infecção.

Material e Métodos

Foi realizado um levantamento das fichas arquivadas, referentes ao período de 2000 a 2013, na Clínica Médica de Grandes Animais do HV/UFCG, para identificação de casos suspeitos de BVD ou DM. Foram identificadas três propriedades com histórico de suspeita,

sendo duas no município de Patos e uma no município de Piancó. No período de julho de 2013 e março de 2014 foram visitadas, além destas, 17 propriedades selecionadas de maneira aleatória, localizadas nos mesmos ou em municípios circunvizinhos (Figura 1) daquelas propriedades identificadas como suspeitas. Nestas visitas foram realizadas coletas de sangue para detecção de anticorpos nos rebanhos e questionários epidemiológicos foram aplicados para obtenção de variáveis (Tabela 1) a serem utilizadas na análise de fatores de risco. No total foram utilizadas 20 propriedades sem histórico de vacinação contra BVDV e distribuídas em nove municípios da Mesorregião do Sertão paraibano: Patos (três propriedades), Santa Terezinha (uma), Itaporanga (uma), Santa Luzia (três), Igaracy (uma), Aguiar (três), São José de Espinharas (uma), Piancó (cinco) e Pombal (duas). O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEP) da UFCG sob o número de protocolo 25-2012.

Para o cálculo do número mínimo de animais a serem amostrados foi considerado a prevalência esperada de 50% (valor adotado para a maximização da amostra), nível de confiança de 95% e erro absoluto de 6% (NOORDHUIZEN et al., 1997), utilizando-se a fórmula para amostras simples aleatórias:

$$n = \frac{z^2 P(1-P)}{d^2}$$

Onde:

n = número de animais amostrados;

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95%;

P = prevalência esperada;

d = erro absoluto.

O número mínimo de animais a serem amostrados foi de 267, no entanto, foram selecionados 359 animais. Foram selecionados para colheita de sangue todos os bovinos existentes nas propriedades no momento da visita. As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção dos soros, que posteriormente foram armazenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a detecção de anticorpos anti-BVDV foi utilizado o kit comercial ELISA indireto IDEXX BVDV p80 Ab *Test* (Instituto Pourquier, Montellier SAS, France), que emprega a

proteína não estrutural p80 como antígeno e que apresenta sensibilidade e especificidade de 97,6% e 97,27%, respectivamente, conforme informações do *Validation Data Report* do kit. O teste foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando placas de poliestireno de 96 poços e leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm (A_{450}). Os resultados foram calculados a partir da porcentagem de inibição de acordo com a seguinte fórmula: $A/N = 100 \times (Amostra A450/ CNx)$, onde A/N é a relação da amostra, Amostra A450 é a amostra a ser avaliada e CNx é a média do controle negativo. O resultado obtido foi interpretado da seguinte forma: amostras com relação A/N superior ou equivalente a 50% foram consideradas negativas; amostras com relação A/N inferior ou equivalente a 40% foram consideradas positivas; e amostras com relação A/N entre 40 e 50% foram consideradas suspeitas.

A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, cada variável independente foi cruzada com a variável dependente (condição sorológica do animal). As variáveis que apresentaram valor de $P \leq 0,2$ pelo teste de Qui-quadrado foram selecionadas para a análise multivariada, utilizando regressão logística múltipla (HOSMER; LEMESHOW, 2000). O ajuste do modelo final foi verificado com o coeficiente de determinação (R^2). A colinearidade entre as variáveis predictoras foi verificada por meio de análise de correlação e, para aquelas que apresentaram forte colinearidade (coeficiente de correlação $> 0,9$), uma das duas foi excluída da análise múltipla de acordo com a plausibilidade biológica (DOHOO et al., 1996). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5% e todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 20.0 *for Windows*.

Resultados e Discussão

Sete amostras foram consideradas suspeitas e não entraram no cálculo da frequência de animais soropositivos. Dos 352 animais avaliados, 141 (40,1%; IC 95% = 34,9% - 45,2%) foram soropositivos. Das 20 propriedades avaliadas, em 19 (95%) foram detectados animais soropositivos, e a frequência de animais soropositivos por propriedade variou de 4,5% a 85,7%. Comparado a outros estudos de prevalência realizados no Nordeste do Brasil, nos quais foram encontradas frequências de soropositividade de 67,3% em São Luís, Maranhão (SOUSA et al., 2013), 65,66% nas regiões de Bacabal e Pedreiras, Maranhão (CHAVES et al., 2009) e 72,6% em nove municípios da microrregião do agreste meridional pernambucano (CASTRO et al., 1993), o Semiárido da Paraíba apresentou frequência relativamente baixa,

porém, superior à taxa de 22,2% relatada por Thompson et al. (2006), também na Paraíba. Por outro lado, os resultados levantam preocupação, pois se observa a elevação no percentual de animais positivos em regiões com histórico de suspeita clínica de DM, sugerindo que na Mesorregião do sertão o vírus está se disseminando entre os rebanhos. Esses dados são uma indicação de que frequências ainda maiores de animais positivos podem ser encontradas em outras regiões da Paraíba, uma vez que a prevalência da infecção pode variar de acordo com a região, levando em consideração fatores como a densidade populacional bovina e o manejo utilizado.

As frequências de animais soropositivos por município são apresentadas na Figura 1. Pelo levantamento realizado no arquivo de fichas clínicas do HV foi possível verificar que os animais que tiveram diagnóstico presuntivo de DM eram provenientes dos municípios de Piancó e Patos, que juntamente com os municípios de Aguiar, Pombal e Igaracy apresentaram as maiores frequências de animais soropositivos no presente trabalho. Vale ressaltar que no município de Pombal o vírus já foi isolado (WEBER et al., 2014) e que é frequente a venda ou permuta de animais na região, o que pode contribuir para a disseminação do agente viral.

A presença do BVDV em rebanhos induz uma resposta humoral com a produção de anticorpos naqueles animais que entraram em contato com o vírus, e estes tornam-se soropositivos por toda a vida, mesmo após a remoção de animais identificados como PI (HOUE, 1992). Respostas vacinais não induzem resposta sorológica de magnitude e duração adequadas na maioria dos animais, e há produção de títulos baixos e de curta duração quando utilizadas vacinas inativadas em comparação com vacinas de vírus vivo modificado (VOGEL et al., 2002). Porém, na região, a vacinação contra o BVDV não é praticada, o que demonstra que esses anticorpos podem ser atribuídos à presença do vírus nos rebanhos. Outro fator que garante que a resposta sorológica se deve à infecção, é que, no Brasil, somente as vacinas inativadas são licenciadas, e apenas vacinas vivas induzem anticorpos contra a proteína NS3. Ou seja, utilizando-se o teste de ELISA, detecta-se a resposta à infecção natural.

De acordo com Brownlie et al. (1989) o BVDV, quando presente nos rebanhos, o vírus induz altas taxas de soropositividade, variando de 60% a 90%. Houe e Meyling (1991) afirmaram que a presença ou ausência de animais PI em rebanhos pode ser evidenciada por meio da sorologia, pois em estudo comparativo observou-se que em dez rebanhos com animais PI, 87% dos animais foram soropositivos em comparação a 43% de soropositividade em nove rebanhos sem a presença de animais PI. A alta prevalência de animais soropositivos é uma evidência indireta da presença de animais PI, e essa relação tem sido utilizada como forma de diagnóstico preliminar do rebanho, testando uma pequena amostra deste para a

detecção de anticorpos contra BVDV em áreas onde a vacinação não é praticada. As taxas de positividade encontradas nas 19 propriedades na Paraíba variaram de 4,5% a 85,7%, e em seis propriedades essa taxa foi acima de 60%. A partir desta informação, novos estudos deverão ser realizados nestas propriedades para tentar identificar animais PI ou transitoriamente infectados (TI).

Os animais PI são considerados os principais disseminadores do vírus, pois são comumente assintomáticos, sorologicamente negativos e eliminam o vírus de forma contínua por secreções e excreções (FULTON et al., 2005). A manifestação dos sinais clínicos da DM pode surgir em animais com até 24 meses de idade, situação em que os riscos de disseminação por todo o rebanho são ainda maiores (RIDPATH; FLORES, 2007). O percentual de animais positivos nas propriedades localizadas em municípios em que não houve suspeita de DM (Santa Terezinha, Itaporanga, Santa Luzia e São José de Espinharas) foi inferior aos obtidos nos municípios em que houve registro da enfermidade (Piancó, Patos e Pombal).

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise univariada para os fatores de risco. As variáveis selecionadas ($P \leq 0,20$) para a análise múltipla foram: área da propriedade, densidade de animais, idade ao desmame, comprar animais, permutar animais, mortalidade de bezerros, ocorrência de abortamentos, idade do aborto, diminuição da produção de leite, manejo reprodutivo, piquete de parição e restrição na entrada de pessoas. No modelo final de regressão logística (Tabela 2), os fatores de risco identificados foram: área de até 120 ha ($OR = 3,06$), alta densidade de animais ($OR = 3,48$), idade ao desmame até 60 dias ($OR = 10,99$), permuta de animais ($OR = 4,95$), mortalidade de bezerros $> 5\%$ ($OR = 2,33$) e utilização de monta natural + inseminação artificial ($OR = 3,06$). O modelo final apresentou bom ajuste ($R^2 = 0,347$).

Animais criados em propriedades com áreas de até 120 ha e alta densidade apresentaram maior risco de serem soropositivos em comparação com animais criados em propriedades com áreas maiores do que 120 ha e densidades populacionais menores. Essa combinação de menor área e altas densidades sugere maior aglomeração e contato direto entre os animais, o que favorece a disseminação do BVDV, uma vez que o contato direto é o modo mais eficiente de transmissão do vírus, principalmente se no rebanho houver animais PI (NISKANEN et al., 1996).

Há maior risco de soropositividade também em animais mantidos em propriedades nas quais o desmame é feito até 60 dias de idade. Na verdade, ruminantes neonatos apresentam índices praticamente insignificantes de gamaglobulinas, que apenas se elevam quando ocorre

a ingestão de colostro de qualidade e no tempo adequado. Entre 15 e 30 dias de idade há diminuição significativa dos teores de gamaglobulina, o que provavelmente se deve ao consumo ou degradação das imunoglobulinas transferidas passivamente (TIZARD, 2002). Quando os anticorpos maternos declinam, o animal rapidamente adquire a competência imunológica pelo início da síntese endógena de imunoglobulinas (ECKERSALL, 1997). Isso geralmente ocorre a partir dos 60 dias de idade, com valores máximos aos 150 dias, onde há um aumento significativo dos teores da gamaglobulina, provavelmente pela resposta do animal aos estímulos causados quando exposto aos antígenos (TIZARD, 2002; CORTESE, 2009). Portanto, é aproximadamente aos 60 dias que o bezerro passa a desenvolver sua própria imunidade; logo, se desmamados antes desse período, tornam-se mais vulneráveis aos antígenos presentes no ambiente, somado ao fato de que tal prática de desmame pode causar estresse no animal.

A compra e a permuta de animais são fatores de risco clássicos para a ocorrência e disseminação de doenças infecciosas e parasitárias. Na região estudada, é comum a permuta de animais sem, contudo, realização de testes de diagnóstico para BVDV, o que pode ser um fator importante para a disseminação do agente nos rebanhos. Vale ressaltar que a única propriedade que não apresentou animais positivos não tem histórico de compra ou troca de animais há muitos anos.

A mortalidade de bezerros acima de 5% não deve ser encarada como fator de risco para a ocorrência da doença, mas como uma consequência da infecção, que pode também estar associada a falhas no manejo dos neonatos. No entanto, o risco de ocorrência de bezerros PI nos rebanhos com taxas de mortalidade acima de 5% é real, pois apesar de poderem manifestar os sinais clínicos tardiamente, os animais PI geralmente têm crescimento retardado, malformações congênitas e são mais suscetíveis a infecções secundárias (RIDPATH; FLORES, 2007). Segundo Brownlie (2002), agentes como herpesvírus bovino tipo 1, coronavírus, *Pasteurella haemolytica*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* e *Salmonella* spp. são frequentemente associados a quadros clínicos de BVD.

No semiárido paraibano, algumas propriedades utilizam a monta natural associada à inseminação artificial no manejo reprodutivo, o que também foi identificado como fator de risco. Quincozes et al. (2007) já haviam relatado que o uso de inseminação artificial e de monta natural contribuiu para o aumento do risco de soropositividade no Rio Grande do Sul. A utilização da inseminação artificial tem se tornado cada vez mais comum pelo crescimento de programas de assistência técnica que incentivam esta prática a baixos custos. No entanto, algumas medidas de controle de qualidade são necessárias para garantir que as técnicas de

reprodução assistida não sejam facilitadoras da transmissão do vírus (GIVENS; WALDROP, 2004). Quando realizadas de acordo com normas internacionais, com controle sanitário do rebanho e processamento adequado do sêmen, a inseminação é um procedimento de reprodução assistida consolidado e seguro. Porém, em alguns casos se desconhece a origem e qualidade do sêmen utilizado, tornando as fêmeas e o próprio rebanho suscetíveis. Weber et al. (2014), ao relatarem o surto de BVD no estado da Paraíba, sugeriram que uma das portas de entrada do vírus na propriedade tenha sido a compra de um touro e algumas vacas da região sul do Brasil ou a utilização inadvertida de doses de sêmen.

A correção dos fatores de risco identificados no presente trabalho poderia contribuir para reduzir a prevalência da infecção viral na região. Desta forma, sugerem-se as seguintes medidas: (a) desmamar apenas a partir dos 60 dias, época em que os bezerros encontram-se mais competentes para produzirem respostas eficazes; (b) aumentar as áreas de permanência dos animais com o intuito de diminuir as altas densidades populacionais; (c) a compra ou permuta de animais devem ser precedidas de teste dos animais para BVDV; (d) maior cautela quando da aquisição de sêmen para inseminação artificial, que deve ser proveniente de touros submetidos a controle sanitário.

Conclusão

Sugere-se que para evitar a difusão da infecção pelo BVDV em rebanhos bovinos do sertão paraibano, é importante a correção dos fatores de risco identificados no presente trabalho. É necessário que outros estudos epidemiológicos sejam realizados no âmbito estadual para identificar a real prevalência da infecção e a presença de animais persistentemente infectados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro. À Prof^{ta}. Dr^a. Marcia Almeida de Melo pelo apoio técnico e laboratorial.

Referências

BACHOFEN, C.; VOGT, H-R.; STALDER, H.; MATHYS, T.; ZANONI, R.; HILBE, M.; SCHWEIZER, M.; PETERHANS E. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea vírus from cattle to goats and among goats. *Veterinary Research*, London, v. 44, n. 32, p. 1-10, 2013.

BOOTH, R. E.; CRANWELL, M. P.; BROWNLIE, J. Monitoring the bulk milk antibody response to BVDV: the effects of vaccination and herd infection status. *Veterinary Record*, London, v. 172, n. 17, p. 449-456, 2013.

BROWNLIE, J.; CLARK, M. C.; HOWARD, C. J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Research in Veterinary Science*, London, v. 46, n. 3, p. 307-311, 1989.

BROWNLIE, J. Bovine diarrhoea virus: pathogenesis and control. Proceedings of the XXII World Buiatrics Congress, Hannover. 2002.

CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H.; ABREU S. R. O.; MUNIZ, A. M. M.; ALBUQUERQUE A. P. S. Anticorpos neutralizantes contra *Pestivirus* em soros bovinos no estado do Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 11, p. 1327-1331, 1993.

CHAVES, P. N.; BEZERRA, D. V.; BORGES, F. C.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados nas regiões de Bacabal e Pedreiras, estado do Maranhão. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, Suplemento 1 (Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria), p. 502-507, 2009.

CORTESE, V. S. Neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, New York, v. 25, n. 1, p. 221-227, 2009.

DOHOO, I. R.; DUCROC, C.; FOURICHON, C.; DONALD, A.; HURNIK, D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Preventive Veterinary Medicine*, London, v. 29, n. 3, p. 221-239, 1996.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5^a ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 116-155.

FULTON, R. W.; BRIGGS, R. E.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; CONFER, A. W.; PAYTON, M. E.; DUFF, G. C.; STEP, D. L.; WALKER, D. A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Ottawa, v. 69, n. 3, p. 161-169, 2005.

GIVENS, M. D.; WALDROP, J. G. Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production systems. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, New York, v. 20, n. 1, p. 21-38, 2004.

GROOMS, D. L.; KEILEN, E. D. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, New York, v. 9, n. 4, p. 898-900, 2002.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, New York, v. 20, v. 1, p. 5-19, 2004.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375p.

HOUE, H.; MEYLING, A. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine*, London, v. 11, n. 1, p. 9-16, 1991.

HOUE, H. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Research in Veterinary Science*, London, v. 53, n. 3, p. 320-323, 1992.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Stanford, v. 18, n. 5, p. 427–436, 2006.

NISKANEN, R.; LINDBERG, A.; LARSSON, B.; ALENIUS, A. Primarily BVDV-infected calves as transmitters of the infection. Proceedings of the XIX World Buiatrics Congress, Edinburgh, Scotland, p. 593-595, 1996.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOF, C. M.; GRAAT, E. A. M. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen: Wageningen Press. 1997. 445p.

PRESI, P.; HEIM, D. BVD eradication in Switzerland - a new approach. *Veterinary Microbiology*, Amsterdã, v. 142, n. 1-2, p. 137-142, 2010.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas por vírus e Chlamydia-I. In: RADOSTITS, O. M.; GAY, C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 974-993.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1ª ed. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 582-589.

RODNING, S. P.; GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D.; ZHANG, Y.; RIDDELL, K. P.; GALIK, P. K.; HATHCOCK, T. L.; GARD, J. A.; PREVATT, J. W.; OWSLEY, W. F. Reproductive and economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus into a naive group of heifers. *Theriogenology*, London, v. 78, n. 7, p. 1508-1516, 2012.

ROSSMANITH W., Deinhofer M., Janacek R., Trampler R. & Wilhelm E. Voluntary and compulsory eradication of bovine viral diarrhoea virus in Lower Austria. *Veterinary Microbiology*, Amsterdã, v. 142, n. 1-2, p. 143-149, 2010.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, Amsterdã, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.

SOUSA, V. E.; BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 21-25, 2013.

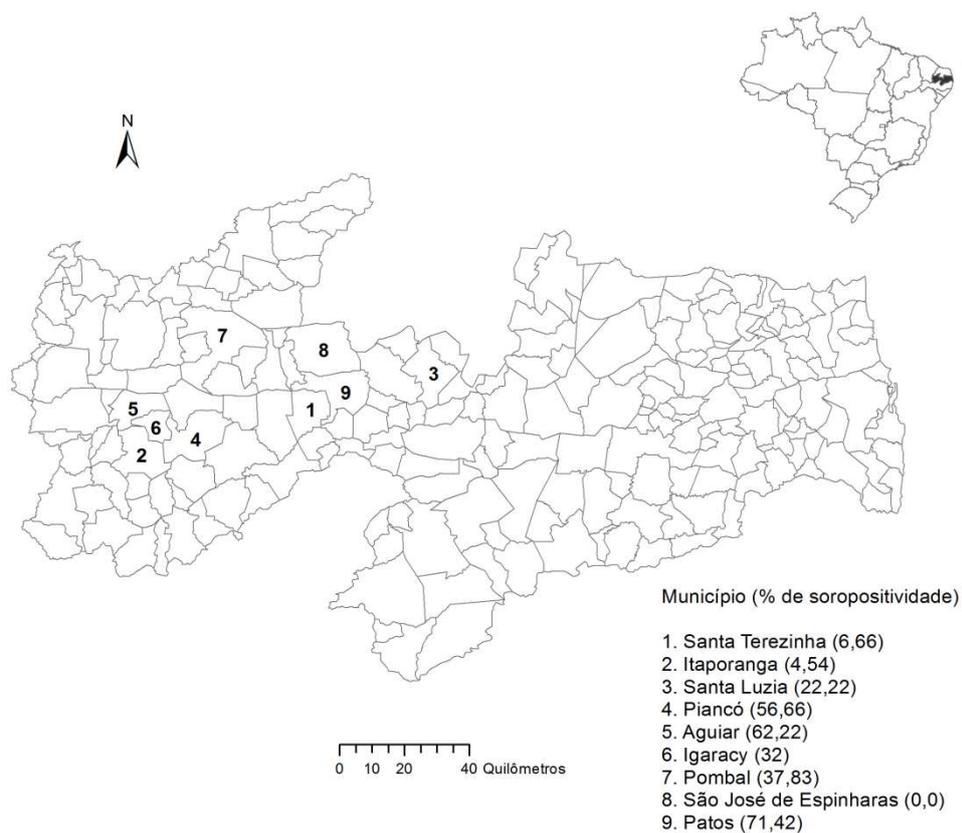
STAHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe —an update. *Japanese Journal of Veterinary Research*, Hokkaido, v. 60, Supl, S:31-39, 2012.

WEBER, M. N.; MÓSENA A. C. S.; SIMÕES, S. V. D.; ALMEIDA, L. L.; PESSOA, C. R. M.; BUDASZEWSKI, R. F.; SILVA, T. R.; RIDPATH, J. F.; RIET-CORREA, F.; DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with ‘hobi’-like pestivirus in a field outbreak. *Transboundary and Emerging Diseases*, Oxford, v. 63, n. 1, p. 92-100, 2014.

THOMPSON, J. A.; LEITE, R. M. H.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; PRADO, P. E. F.; LOBATO, Z. I. P.; BRITO, C. P. T.; LAGE, A. P. Spatial and hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in State of Paraíba, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, London, v. 76, n. 3-4, p. 290-301, 2006.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; MAYER, S. V.; QUADROS, V. L.; OLDONI, I. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 83-89, 2002.

Figura 1. Mapa do Estado da Paraíba demonstrando os municípios utilizados no estudo da sorologia para diarreia viral bovina e a frequência dos animais soropositivos..



Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 1. Análise univariada com as variáveis mais associadas ($P \leq 0,20$) à soropositividade para BVDV em bovinos do semiárido paraibano.

Variável	Categoria	Nº. total de bovinos	Nº. de bovinos positivos (%)	P
Tipo de exploração	Leite	177	78 (44,1)	0,219
	Carne	12	3 (25,0)	
	Mista	163	60 (36,8)	
Tipo de criação	Extensiva	113	47 (41,6)	0,650
	Intensiva	39	13 (33,3)	
	Semi-intensiva	200	81 (40,5)	
Área da propriedade	Até 120 ha ^a	172	89 (51,7)	<0,001*
	> 120 ha	148	36 (24,3)	
Área de pastejo	Até 10 ha	183	77 (42,1)	0,245
	> 10 há	137	48 (35,0)	
Densidade em áreas comuns	Média	114	21 (18,4)	<0,001*
	Baixa	167	80 (47,9)	
	Alta	71	40 (56,3)	
Idade ao desmame	Entre 60-90 dias	15	1 (6,7)	0,004*
	Até 60 dias	192	71 (37,0)	
	> 90 dias	145	69 (47,6)	
Tipo de ordenha	Não ordenha	12	3 (25,0)	0,525
	Manual	321	131 (40,8)	
	Mecânica	19	7 (36,8)	
Comprar animais	Não	27	7 (25,9)	0,175*
	Sim	325	134 (41,2)	
Permutar animais	Não	252	87 (34,5)	0,001*
	Sim	100	54 (54,0)	
Bezerros fracos	Não	221	93 (42,1)	0,371
	Sim	131	48 (36,6)	
Anomalias em bezerros	Não	321	125 (38,9)	0,237
	Sim	31	16 (51,6)	
Mortalidade de bezerros	< 5%	314	115 (36,6)	<0,001*
	> 5%	38	26 (68,4)	
Ocorrência de abortamento	Não	194	92 (47,4)	

	Sim	158	49 (31,0)	0,003*
Período gestacional	Não aborta	194	92 (47,4)	
	> 3 meses	71	32 (45,1)	
	< 3 meses	87	17 (19,5)	< 0,001*
Retorno ao cio	Não	88	33 (37,5)	
	Sim	264	108 (40,9)	0,660
Diminuição da produção de leite	Não	126	37 (29,4)	
	Sim	226	104 (46,0)	0,003*
Manejo reprodutivo	Monta natural	269	99 (36,8)	
	Monta + IA ^b	83	42 (50,6)	0,034*
Presença de outras espécies	Não	83	28 (33,7)	
	Sim	269	113 (42,0)	0,224
Origem da água	Poço	61	21 (34,4)	
	Rio	62	22 (35,5)	
	Açude	40	21 (52,5)	
	Todos os	189	77 (40,7)	0,266
Quarentena	Não	272	105 (38,6)	
	Sim	80	36 (45,0)	0,370
Piquete de parição	Não	306	113 (36,9)	
	Sim	46	28 (60,9)	0,003*
Restrição na entrada de pessoas	Não	133	36 (27,1)	
	Sim	219	105 (47,9)	<0,001*
Assistência veterinária	Não	133	57 (42,9)	
	Sim	194	76 (39,2)	
	Esporadicament	25	8 (32,0)	0,556

* Variáveis selecionadas para a análise múltipla por regressão logística ($P \leq 0,20$); ^a Hectares;

^b Inseminação artificial

Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 2. Fatores de risco, estimados por regressão logística múltipla, associados à soropositividade para BVDV em bovinos do semiárido paraibano.

Variável	<i>Odds ratio</i>	IC 95%	P
Área de até 120 há	3,06	1,43 – 6,53	0,004
Densidade alta em áreas comuns	3,48	1,24 – 9,79	0,018
Idade ao desmame até 60 dias	10,99	1,31 – 91,9	0,027
Permutar animais	4,95	2,08 – 11,8	< 0,001
Mortalidade de bezerros > 5%	2,33	1,07 – 5,11	0,034
Utilização de monta natural + inseminação artificial	3,06	1,22 – 7,67	0,017

$R^2 = 0,347$

Fonte: Elaboração dos autores

CAPÍTULO II

Deteção do vírus ‘HoBi’-like (BVDV-3) em bovino no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Manuscrito submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira

(Qualis A2)

Detecção do vírus 'HoBi'-like (BVDV-3) em bovino no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil¹

Ana L. A. Marques², Lisanka A. Maia², Gildeni M. N. Aguiar², Matheus N. Weber³, Sara V. D. Simões², Sérgio S. Azevedo^{2*}

ABSTRACT.- Marques A.L.A., Maia L.A., Aguiar G.M.N., Weber M.N., Simões S.V.D. & Azevedo S.S. 2015. Detection of 'HoBi'-like (BVDV-3) vírus in bovine in the semiarid of the Paraíba State, Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira XX(X): XX-XX. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, s/n, bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mail: sergio@vps.fmvz.usp.br*

The aim of this study was to describe the clinical and anatomopathological aspects, and the viral identification of a case of 'Hobi'-like (BVDV-3) vírus infection in cattle from the semiarid of Paraíba State, Northeastern Brazil. A female bovine, three months old, was sent to the UFCG's Veterinary Hospital presenting salivation, difficulty of ceiling seizure, lack of appetite, dark feces and in small amounts. Due to worsening of symptoms it was decided to *in extremis* euthanasia, followed by the necropsy and collection of material for histopathology. Histologically, in the mucous membranes of the digestive tract there were edema, ballooning degeneration, necrosis and inflammatory infiltrate, which was observed on the dorsal surface of the tongue and in its deepest epithelium. The immunohistochemical of skin biopsies of the extremity of the ear (ear notches) showed positive antigenic marking and by RT-PCR it was possible to detect viral RNA of BVDV in the serum, whose cytopathic effect in epithelial cells of bovine kidney lineage "Madin Darby bovine kidney" (MDBK) was not observed. The sequencing of the 5'NCR gene showed that the virus isolated was more related to 'Hobi'-like (BVDV-3); both were conducted in Virology Laboratory of UFRGS. After confirming the diagnosis serum samples were collected from 23 animals for serology by indirect ELISA, and a seropositivity of 69.6% (16/23) was found. The identification of this new case of 'Hobi'-like infection in Paraíba reaffirms the need for regular BVDV monitoring in the region to early detection of infection in the herds and adoption of effective preventive and control measures.

INDEX TERMS: Cattle, BVDV-3, pestivirus, viral identification.

RESUMO.- [Detecção do vírus 'HoBi'-like (BVDV-3) em bovino no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.] **Objetivou-se descrever os aspectos clínicos e anatomopatológicos, e a identificação viral de um caso de infecção pelo vírus 'Hobi'-like (BVDV-3) em bovino do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. Um bovino, fêmea, três meses de idade, foi levado ao Hospital Veterinário da UFCG apresentando salivação, dificuldade de apreensão do teto, falta de apetite, fezes escuras e em pouca quantidade. Diante da piora do quadro clínico optou-se por sua eutanásia *in extremis*, seguida da realização da necropsia e coleta de material para histopatologia. Histologicamente, nas mucosas do trato digestivo, havia edema, degeneração balonosa, necrose e infiltrado inflamatório, que foi observado na face dorsal da língua e no seu epitélio mais profundo. A imunohistoquímica de amostras de extremidade de pavilhão auricular demonstrou marcação antigênica positiva e pela RT-PCR foi possível detectar RNA viral do BVDV no soro sanguíneo, cujo efeito citopático em células epiteliais de rim bovino da linhagem "Madin Darby bovine kidney" (MDBK) não foi observado. O sequenciamento do gene 5'NCR demonstrou que o vírus isolado estaria mais relacionado ao 'Hobi'-like (BVDV-3); ambos foram realizados no laboratório de Virologia da UFRGS. Após a confirmação do diagnóstico foram coletadas amostras de soro dos 23 animais do rebanho para sorologia por ELISA indireto, sendo constatada 69,6% (16/23) de**

¹ Recebido em XXXXX

Aceito para publicação em XXXXX

² Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, s/n, bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mails: analuisa_vet@hotmail.com; lisankavet@hotmail.com; gil_mev@yahoo.com.br; saravdsimoes@gmail.com; Autor para correspondência: sergio@vps.fmvz.usp.br

³ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. E-mail: matheusnweber@gmail.com

soropositividade. A identificação deste novo caso de infecção por 'Hobi'-like na Paraíba reafirma a necessidade de um monitoramento regular para BVDV na região para detecção precoce da infecção dos rebanhos e adoção de medidas eficazes de prevenção e controle.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovino, BVDV-3, pestivirus, identificação viral.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, o qual apresenta quatro espécies antigenicamente relacionadas: o vírus da Peste Suína Clássica; vírus da Doença das Fronteiras, que acomete ovinos; e BVDV-1 e BVDV-2, cujos hospedeiros naturais são os bovinos, mas pode infectar outros ruminantes domésticos e selvagens, incluindo búfalos e veados (Becher et al. 1999, Uttenthal et al. 2005). Apesar de ainda não reconhecidas oficialmente, algumas espécies foram inseridas no gênero *Pestivirus* a partir da semelhança entre suas regiões genômicas. Acredita-se que a natureza de fita simples do gênero favoreça as altas taxas de mutações que são observadas, sendo possível a emergência destas novas linhagens (Bauermann et al. 2013).

Há três grupos recentemente identificados, e dentre eles está o grupo dos pestivirus atípicos que estão estritamente relacionados e inicialmente foram isolados a partir de amostras de soro fetal bovino (Schirrmeier et al. 2004). Incluem-se neste grupo o D32/00_'HoBi' (Schirrmeier et al. 2004) e Brz buf 9 (Stalder et al. 2005), ambos provenientes do Brasil; o CH-KaHo/cont da América do Sul (Stalder et al. 2005) e o Th/04_Khon-Kaen da Tailândia (Stahl et al. 2007). A partir do primeiro isolado do grupo, o D32/00_'HoBi' foi denominado vírus 'Hobi'-like, referido por alguns autores como BVDV-3 (Liu et al. 2009a) pela apresentação clínica semelhante à dos BVDVs já reconhecidos (Bauermann et al. 2013).

A diarreia viral bovina (BVD) apresenta-se geralmente de forma subclínica, contudo pode causar distúrbios respiratórios, digestivos, reprodutivos e/ou hemorrágicos (Baker 1995, Ridpath 2010). O BVDV tem a habilidade de causar dois tipos de infecções no hospedeiro, as transitórias e as persistentes, o que garante seu sucesso e permanência nos rebanhos. A infecção transitória pode ser causada por vírus cp (citopático) ou ncp (não citopático) e acomete animais imunocompetentes, induzindo-os a uma resposta imune capaz de debelar a infecção, tornando-a auto limitante (Houe 1999). Já a persistente ocorre em fetos que estão entre 40 e 125 dias de gestação, quando as vacas prenhes e não imunes ao BVDV se infectam. O vírus, especificamente ncp, atravessa a placenta e entra em contato com o feto, que ainda não possui seu sistema imune suficientemente desenvolvido, reconhecendo erroneamente as proteínas virais como próprias e desenvolvendo imunotolerância específica. Esses animais são conhecidos como persistentemente infectados (PI), os quais apesar de soronegativos eliminam o vírus por secreções e excreções durante toda a vida (Baker 1995, Grooms 2004, Ridpath 2010).

Em novembro de 2011, uma afecção caracterizada por sinais respiratórios e digestivos graves, não responsiva a tratamento, com curso clínico de 15 a 20 dias acometeu bezerros no sertão da Paraíba, causando mortalidade superior a 10%. Na propriedade havia ainda histórico de doença reprodutiva caracterizada por aborto e repetição de cio. Foi possível diagnosticar a presença de anticorpos contra o BVDV no rebanho e isolar em quatro animais estirpes semelhantes ao vírus 'Hobi'-like (Weber et al. 2014). A crescente identificação de pestivirus atípicos em pelo menos três continentes tem suscitado grande preocupação de técnicos e pesquisadores em sanidade animal, pois tais agentes são recentes e suas epidemiologia, biologia e patogenia ainda são pouco conhecidas (Ridpath 2010, Stahl & Alenius 2012). Diante de poucas informações acerca desta nova espécie de BVDV identificado e de sua ocorrência natural, é importante relatar surtos e casos esporádicos onde sinais clínicos e patológicos contribuam para a caracterização deste vírus emergente. No presente trabalho, são descritos os aspectos clínicos, anatomo-patológicos e identificação viral de um caso de infecção pelo vírus 'Hobi'-like em bovino do semiárido da Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

História clínica e coleta de amostras. Em outubro de 2012, um bovino fêmea, três meses de idade e proveniente de propriedade rural do município de Patos, Paraíba, foi encaminhado ao Hospital

Veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) com histórico de que há 15 dias apresentava salivação, dificuldade de apreensão do teto, falta de apetite, fezes escuras e em pouca quantidade. O animal havia apresentado há um mês episódio de diarreia quando então foi vermifugado com melhora clínica. Todos os animais da propriedade estavam sadios e não havia histórico de doença recente, exceto o caso relatado. Todos eram vacinados apenas contra Febre Aftosa. Foi colhido sangue total para hemograma e pesquisa de hemoparasitos e fezes para exame parasitológico. Foram colhidas amostras para biopsia da extremidade dos pavilhões auriculares do animal, de aproximadamente 1cm de comprimento e 0,5cm de largura, que foram acondicionadas em tubos contendo solução de formol a 10% por 24 horas, com posterior desidratação em soluções crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em parafina para imunohistoquímica (IHQ). Adicionalmente coletou-se o soro do animal que foi centrifugado e armazenado em freezer a -70°C para o RT-PCR e isolamento viral. O animal permaneceu interno por 16 dias, porém, diante da piora do quadro clínico optou-se por sua eutanásia *in extremis*, onde foram coletados fragmentos de todos os órgãos e processados de acordo com as técnicas de rotina histopatológica. Após a confirmação do diagnóstico foram colhidas amostras de soro de todos os animais do rebanho para realização da sorologia para BVDV.

Imunohistoquímica. A IHQ foi realizada no Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a partir das amostras do pavilhão auricular. O anticorpo primário monoclonal comercial anti-BVDV #15c-5 (Syracuse Bioanalytical Inc.,USA), que se liga especificamente à proteína Erns dos pestivirus, foi diluído 1:500 em PBS. A recuperação antigênica foi feita com protease XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co., USA) a 0,005% em PBS por 15 minutos a 37°C e as marcações inespecíficas foram reduzidas a partir da utilização de solução de leite desnatado (Molico®) a 5% em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi aplicado por 14 a 16 horas a 4°C, em câmara úmida. Posteriormente, utilizou-se anticorpo secundário biotilado e solução de estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (LSAB + System AP, Dako Cytomation) por 20 minutos cada, a temperatura ambiente. A solução reveladora consistiu de 100µL da solução do cromógeno Permanent Red (Dako Cytomation) que foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. Fez-se contra coloração com hematoxilina por 20 segundos, seguida de lavagem em água e secagem em ar corrente, para posterior passagem em xilol e montagem com Entellan. Lâminas controle positivo de biópsia de orelha foram inseridas em série com as lâminas a serem testadas. Para os controles negativos, substituiu-se o anticorpo primário por PBS (Santos et al. 2011).

RT-PCR. O RNA total foi extraído da amostra de soro do animal utilizando o TRIzol™ LS Reagent (Life Technologies, USA) e suspenso em 50µL de água ultrapura, de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram sintetizados utilizando o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Life Technologies, USA), em volume total de 20µL. A PCR foi preparada em volume total de 25µL que continha 2µL de cDNA, usando dois protocolos para amplificar fragmentos do gene 5'NCR, com o emprego dos primers 324 5'-ATGCCCWGTAGGACTAGCA-30 (posição na cepa de BVDV-1 NADL: 108-128) e 326 5'-TCAACTCCATGTGCCATGTAC-30 (posição na cepa NADL: 395-375), que amplificam um fragmento de 288bp (Vilcek et al. 1994), e 5'-CATGCCCRYAGTAGGACTAGC-30 (posição na cepa NADL: 107-127) e 5'-ATGTGCCATGTACAGCAGAG-30 (posição na cepa NADL: 387-368), que amplificam um fragmento de 280bp (Deregt et al. 2006). Os produtos da amplificação foram marcados com Blue Green® Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil) e eletroforese em gel de agarose a 2%. Como controle positivo foi utilizado a cepa BVDV-1 NADL. Para o sequenciamento do DNA, sequências parciais de 5'NCR (Deregt et al. 2006), foram amplificadas por RT-PCR.

Isolamento viral. O soro positivo no RT-PCR foi inoculado em 25cm² de células epiteliais de rim bovino da linhagem "Madin Darby bovine kidney" (MDBK) mantidas em meio Eagle modificado "Dulbecco's modified Eagle medium" (DMEM) suplementadas com 5% de soro fetal bovino (FCS) livre de BVDV e de anticorpos anti-BVDV, antibióticos (200 IU/ml de penicilina e 200 mg/ml de estreptomicina) e incubado a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 4 dias. A presença de pestivirus não-citopático foi monitorada por ensaio em monocamada de imunoperoxidase usando anti-NS2/3 monoclonal após terceira passagem.

Purificação, sequenciamento e análise filogenética dos produtos de amplificação. Os fragmentos de 5'NCR amplificados na RT-PCR foram purificados utilizando o kit NucleoSpin Extract II (Macherey–Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Germany). As cadeias de DNA foram sequenciadas a partir da RT-PCR com analisador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, utilizando kit de sequenciamento de ciclo BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). As sequências parciais foram montadas usando SegMan (DNASTAR Lasergene® 11, Madison, Wisconsin, USA). O alinhamento das

sequências foi realizado com o Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5 (MEGA 5) (Tamura et al. 2011) usando CLUSTAL W. As sequências dos iniciadores foram excisadas e as sequências resultantes submetidas ao GenBank usando BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para confirmação de sua identidade. Para análise filogenética, o alinhamento foi realizado com o uso do nucleotídeo 189 (5'NCR) dos produtos da RT-PCR e 16 cepas de referência. O software MEGA 5 foi utilizado para a inferência filogenética de acordo com o critério *neighbor-joining* e modelo Kimura de 2 parâmetros.

Sorologia. A sorologia foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Campina Grande, onde os soros foram individualmente submetidos ao teste de ELISA indireto IDEXX BVDV p80 Ab Test (IDEXX Montellier SAS, France) para detecção de anticorpos contra BVDV. As amostras foram processadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando-se placas de poliestireno de 96 poços e leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm (A_{450}). Os resultados foram calculados a partir da porcentagem de inibição de acordo com a seguinte fórmula: $A/N = 100 \times (\text{Amostra } A_{450} / \text{CNx})$, onde A/N é a relação da amostra, Amostra A450 é a amostra a ser avaliada e CNx é a média do controle negativo. O resultado obtido foi interpretado da seguinte forma: amostras com relação A/N superior ou equivalente a 50% foram consideradas negativas; amostras com relação A/N inferior ou equivalente a 40% foram consideradas positivas; e amostras com relação A/N entre 40 e 50% foram consideradas suspeitas.

RESULTADOS

A partir do exame físico observou-se apatia, estado nutricional magro, anorexia, bruxismo, mucosas congestas, hipertrofia dos linfonodos pré-escapulares, úlceras na cavidade oral, glossite com lesões de coloração amarelada, secreção nasal bilateral purulenta e feridas com crostas no espelho nasal, fezes pastosas em pequena quantidade, com muco, escuras e fétidas, além de tenesmo e desidratação de 8%. Dos exames laboratoriais, houve apenas alteração no hemograma, que revelou hemoconcentração e aumento no valor do hematócrito e proteína total.

Na necropsia observou-se espessamento difuso e acentuado da superfície dorsal da língua por material branco amarelado, friável e granular que se desprendia facilmente (Fig. 1A). O mesmo material foi visto aderido à porção inicial do retículo e nas folhas do omaso, causando espessamento dos favos de mel e folhas. No esôfago havia áreas multifocais ulceradas com superfície avermelhada e outras áreas erosivas com superfície esbranquiçada, elevada e irregular. Lesões macroscópicas não foram observadas em outros órgãos.

Microscopicamente as lesões caracterizaram-se por formações vesículo pustulares erosivas e ulcerativas observadas no epitélio da língua, esôfago, rumen, retículo e omaso. Na face dorsal da língua observou-se glossite necrosupurativa e erosiva associada à degeneração balonosa e pústulas. O epitélio superficial estava acentuadamente necrótico, formando camadas, e entre elas havia formação de vesículas e pústulas (Fig. 1B). No epitélio mais profundo observou-se moderada hiperplasia, degeneração balonosa e necrose individual de queratinócitos. Na submucosa havia infiltrado inflamatório mononuclear discreto situado principalmente ao redor de vasos. Lesões erosivas semelhantes também foram observadas na mucosa do rumen, retículo e omaso. No esôfago as lesões foram predominantemente ulcerativas, com áreas multifocais de necrose do epitélio da mucosa associada a fibrina e agregados bacterianos. Nas áreas adjacentes havia erosões e formação de cavitação, com separação e desprendimento do epitélio da mucosa.

A IHQ demonstrou marcação antigênica positiva dos queratinócitos. Na RT-PCR foi possível detectar RNA viral de BVDV no soro sanguíneo. O isolamento viral foi realizado a partir deste soro positivo na RT-PCR, cujo efeito citopático não foi observado. A árvore filogenética obtida (Fig. 2) demonstra seis *clusters* separados que correspondem aos pestivirus BVDV-1, BVDV-2, CSFV, BDV, vírus Pronghorn antelope e 'Hobi'-like. A amostra detectada no presente estudo apresentou 99% de identidade com as cepas D32/00_HoBi (Número de acesso no GenBank: KP715144.1), detectada como contaminante de soro fetal bovino de origem brasileira (Schirrmeyer et al. 2004) e LV04/12 HoBi (Número de acesso no GenBank: KC465391.1), detectada em bovino com sintomatologia semelhante a doença das mucosas em Pombal, Paraíba, Brasil (Weber et al. 2014). Portanto, a amostra viral detectada no presente estudo (denominada PB22487/12) está mais relacionada com o vírus 'Hobi'-like. O levantamento sorológico da propriedade revelou que 69,6% (16/23) dos animais foram soropositivos para o BVDV.

DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados são determinados diretamente pela replicação viral ou por infecções secundárias decorrentes da imunodeficiência induzida por ele (Potgieter 1995), e neste animal acometeu principalmente o trato digestivo. Alguns autores afirmam que o BVDV-3, em infecções naturais e experimentais, também está relacionado a síndromes respiratórias (Decaro et al. 2011, 2012b, Larska et al. 2012), abortos (Cortez et al. 2006, Bianchi et al. 2011, Decaro et al. 2012a) e episódios de piroxia sem outras manifestações clínicas (Ridpath et al. 2013), de maneira que estas afecções são clinicamente semelhantes às aquelas causadas pelo BVDV-1 e BVDV-2 (Decaro et al. 2013, Weber et al. 2014).

As alterações hematológicas foram consequentes à desidratação do animal, que apresentou policitemia pela redução do volume plasmático. Geralmente o consumo hídrico de animais enfermos é inadequado para manter o conteúdo de água corporal normal, resultando em hemoconcentração, que aumenta o hematócrito e a proteína plasmática total (Lopes et al. 2007). Decaro et al. (2013) observaram apenas moderada linfopenia sem encontrar outras alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de um bezerro PI por BVDV-3, enquanto Weber et al. (2014) relataram leucopenia e neutrofilia nas mesmas circunstâncias. A maioria dos bovinos infectados apresentam leucopenia transitória e neutropenia, e em infecções persistentes, diferentemente do que ocorre na infecção aguda, a imunodepressão é induzida principalmente por alterações nas funções de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, pela afinidade do vírus por células de defesa, causando sua destruição e prejuízo funcional das células sobreviventes (Potgieter 2004).

A partir do exame necroscópico pôde-se observar alterações macroscópicas que variam consideravelmente, especialmente em casos agudos, em que o trato alimentar superior e as lesões intestinais estão quase sempre presentes, no entanto, neste animal não foram observadas lesões intestinais. As úlceras e erosões por toda a mucosa do trato digestivo estão presentes em muitos bezerros afetados, bem como as crostas nas narinas e focinho, o que já foi citado como lesões macroscópicas características encontradas em animais PI. No esôfago, as erosões podem ser lineares ou irregulares, e neste caso apresentaram a superfície avermelhada, denotando hiperemia não reativa, que podem estar recobertas por epitélio necrótico ou por placas amarelo-esbranquiçadas ligeiramente elevadas de epitélio proliferativo, lesões estas semelhantes às encontradas na parede do rumen e no omaso, onde estão mais presentes ao longo das bordas de suas folhas (Shin & Acland 2001, Flores 2003, Brown et al. 2004).

Histologicamente, nas mucosas do trato digestivo, Flores (2003) referiu edema, degeneração balonosa, necrose e infiltrado inflamatório, o que foi observado na face dorsal da língua e no seu epitélio mais profundo do animal acometido. Esse foco necrótico estende-se progressivamente e por coalescência pode formar pequenas vesículas de clivagem ao longo da junção própria do epitélio, levando a erosões e ulcerações (Brown et al. 2004). Na submucosa da língua o infiltrado inflamatório mononuclear discreto estava situado principalmente ao redor de vasos, causando vasculite, que em associação com a infecção pelo BVDV, tem sido relatada nas infecções agudas pelo BVDV-2 e também na doença das mucosas, cujas lesões podem ser causadas pelo depósito de imunocomplexos nas paredes vasculares devido ao aumento nos títulos de anticorpos (Odeon et al. 1999, Liebler-Tenorio et al. 2003).

Para alguns autores, somente o tipo viral envolvido não é capaz de explicar todas as variações das formas de apresentação da doença, sendo necessário outros fatores como a imunidade do rebanho, as práticas de manejo adotadas como a vacinação, bem como a localização regional e o contato com outros rebanhos que contribuem também para a ocorrência de surtos, que tendem a ser mais evidentes quando novos tipos virais, como o 'Hobi'-like, são introduzidos em rebanhos não imunes (Grooms 2006, Santos et al. 2011).

A característica persistente da infecção foi confirmada pela coloração imunohistoquímica de amostras de biópsia da pele, que de acordo com Grooms & Keilen (2002) é um método confiável para a triagem de bezerros PI pelo BVDV. A presença do vírus em estruturas da pele é restrita a este tipo de infecção e a IHQ pode diferenciá-la da infecção transitória ou aguda, nas quais o antígeno viral não é encontrado em estruturas epidérmicas da pele (Hilbe et al. 2007). Através do isolamento viral foi possível identificar o caráter não citopático da cepa, indicando a ausência da doença das mucosas neste animal. Decaro et al. (2013) monitorou um animal PI por BVDV-3 durante um período maior que seis meses em que este não desenvolveu a doença das mucosas, apresentando apenas a cepa não citopática, retardo do crescimento e diversas infecções secundárias durante o período do estudo devido à imunossupressão causada pelo vírus.

No presente trabalho, a alta porcentagem de bovinos soropositivos em rebanho não vacinado confirma a sua exposição ao BVDV, principalmente quando há presença de animal PI e sua identificação é tardia, o que favorece a disseminação do vírus, uma vez que há tempo da maioria dos animais entrarem em contato com o animal suspeito (Arenhart et al. 2009). Esse percentual, de acordo com Houe & Meyling (1991), pode atingir até 87% dos bovinos expostos quando há um animal PI no rebanho. Moerman et al.

(1993) afirmaram haver soroconversão de todos os bovinos soronegativos do rebanho após o contato com um animal PI em um período de até três meses.

A permuta de animais não era prática comum dentro do rebanho, porém, ocasionalmente havia contato com animais vizinhos, e esse contato direto com animais agudamente infectados pode contribuir para a transmissão do vírus, embora de maneira menos eficiente (Meyling et al. 1990). Entretanto, alguns autores afirmam que a possibilidade de transmissão a partir de animais acometidos transitariamente é mínima em relação ao PI, uma vez que a duração da infecção e quantidade de vírus por eles excretados é bem menor (Niskanen et al. 2000, Niskanen et al. 2002). Apesar da semelhança entre a cepa viral isolada neste relato com a do surto relatado por Weber et al. (2014) em uma região próxima, o proprietário afirma que não adquiria animais provenientes daquele local.

A exposição deste rebanho a um animal PI o fez desenvolver uma resposta imunológica satisfatória pela quantidade de animais soroconvertidos e pelos mínimos prejuízos que o vírus causou ao rebanho como um todo. Segundo Brownlie (1990), após o contato com o vírus, o animal permanece soropositivo para BVDV durante toda a sua vida. Porém, para outros autores, essa soroconversão não resulta necessariamente em proteção ao longo da vida contra uma reinfeção (Lindberg et al. 2008). Neste sentido, um programa de vacinação, por exemplo, não previne todas as infecções em animais individualmente (Ridpath et al. 2013). Dezen et al. (2013) demonstraram que em um rebanho vacinado contra o BVDV e apresentando problemas reprodutivos foi possível isolar o vírus. Por esta razão a vacinação para BVDV, por si só, pode não eliminar o BVDV das populações (O'Rourke 2002, Lindberg & Houe 2005, Ridpath 2010, Ridpath et al. 2013), sendo importante apenas para reduzir a incidência de infecções agudas e persistentes em um rebanho.

CONCLUSÃO

Através da sintomatologia clínica, alterações anatomopatológicas, isolamento viral e sequenciamento genético, foi possível identificar um animal acometido pelo vírus 'Hobi'-like, contribuindo assim, para uma melhor caracterização da manifestação desse vírus emergente na região. Além disso, a identificação deste novo caso de infecção por 'Hobi'-like na Paraíba reafirma a necessidade de monitoramento regular para BVDV na região para detecção precoce da infecção dos rebanhos e adoção de medidas eficazes de prevenção e controle.

REFERÊNCIAS

- Arenhart S., Bauerman F.V., Oliveira S.A.M., Weiblen R. & Flores E.F. 2009. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. *Pesq. Vet. Bras.* 29(9):736-742.
- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11:425-445.
- Bauermann F.V., Harmon A., Flores E.F., Falkenberg S.M., Reecy J.M. & Ridpath J. F. 2013. In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhea viruses 1 and 2. *Vet. Microbiol.* 166:242-245.
- Becher P., Orlich M., Kosmidou A., König M., Baroth M. & Thiel H-J. 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262:64-71.
- Bianchi E., Martins M., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesq. Vet. Bras.* 31:649-655.
- Brown C.C., Baker D.C. & Barker K. 2004. Alimentary system, p.140-148. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 2. 4ed. Academic Press, San Diego.
- Brownlie J. 1990. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 23:371-382.
- Cortez A., Heinemann M.B., Castro A.M.M.G., Soares R.M., Pinto A.M.V., Alfieri A.A., Flores E.F., Leite R.C. & Richtzenhain L.J. 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 50-UTR region. *Pesq. Vet. Bras.* 26:211-216.

- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E., Buonavoglia C. 2011. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1549-1552.
- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Sciarretta R., Pinto P., Buonavoglia D., Martella V. & Buonavoglia C. 2012a. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *J. Clin. Microbiol.* 50:509-512.
- Decaro N., Mari V., Pinto P., Lucente MS, Sciarretta R., Cirone F, Colaianni ML, Elia G. & Buonavoglia C. 2012b. Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from diseased animal. *J. Gen. Virol.* 93:1976-1983.
- Decaro N., Losurdo M., Lucente M.S., Sciarretta R., Mari V., Larocca V., Elia G., Cavaliere N., Martella V., Fasanella A. & Buonavoglia C. 2013. Persistent infection caused by HoBi- like pestivirus. *J. Clin. Microbiol.* 51:1241-1243.
- Deregt D., Gilbert S.A., Dudas S., Pasick J., Baxi S., Burton K. M. & Baxi M.K. 2006. A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses. *J. Virol. Methods* 136:17-23.
- Dezen S., Otonel R.A.A., Alfieri A.F., Lunardi M. & Alfieri A.A. 2013. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):141-147.
- Flores E.F. 2003. Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). *Biológico* 65(1-2):3-9.
- Grooms D.L. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20:5-19.
- Grooms D.L. 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenol.* 66(3):624-628.
- Grooms D.L. & Keilen E.D. 2002. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(4):898-900.
- Hilbe M., Arquint A., Schaller P., Zlinszky K., Braun U., Peterhans E. & Ehrensperger F. 2007. Immunohistochemical diagnosis of persistente infection with Bovine Diarrhea Virus (BVDV) on skin biopses. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 149(8):337-344.
- Houe H. & Meyling A. 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Med.* 11:9-16.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64:89-107.
- Moenning V., Houe H. & Lindeberg A. 2005. BVD control in Europe: Current status and perspectives. *Anim. Health Res. Rev.* 6(1):63-74.
- Larska M., Polak M.P., Riitho V., Strong R., Belak S., Alenius S., Uttenthal A. & Liu L. 2012. Kinetics of single and dual infection of calves with an Asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea virus 1. *Comp. Immunol. Microbiol.* 35:381-390.
- Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F. & Neil J.D. 2003. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(3):221-232.
- Lindberg A. & Houe H. 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72:55-73.
- Lindberg A., Niskanen R. & Alenius S. 2008. Persistence of antibodies to type 1 BVDV after natural infection and fetal protection against challenge with a strain of a homologous genotype. *Proceedings of the 7th ESVV Pestivirus Symposium, Uppsala, Sweden*, p.62.
- Liu L., Xia H., Wahlberg N., Bélak S. & Baule C. 2009a. Phylogeny classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virol.* 385:351-357.
- Liu, L., H. Xia, C. Baule, & S. Belak. 2009b. Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. *Arch. Virol.* 154:1111-1116.
- Lopes S.T.A., Biondo A.W. & Santos A.P. 2007. *Manual de Patologia Clínica Veterinária* 3. ed. - Santa Maria: UFSM-Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 107 p.
- Meyling A., Houe H. & Jensen A.M. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 75-93.
- Moerman A., Straver P.J., Dejong M.C.M., Quak J., Baanvinger T. & Van Oirschot J.T. 1993. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet. Rec.* 132:622- 626.
- Niskanen R., Lindberg A., Larsson B. & Alenius, S. 2000. Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. *Acta Vet. Scand.* 41:93-99.

- Niskanen R., Lindberg A. & Traven, 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.
- Odeon A.C., Kelling C.L., Marshall D.J., Estela E.S., Dubovi E.J. & Donis R.O. 1999. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:221–228.
- O'Rourke K. 2002. BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220 (12):1770-1773.
- Potgieter L.N. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11:501-520.
- Potgieter L.N. 2004. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. *Infectious diseases of Livestock.* 2 ed. v2. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, p.946-969.
- Ridpath J.F., Falkenberg S.M., Bauermann F.V., Vanderley B.L., Do Y., Flores E.F., Rodman D.M. & Neill J.D. 2013. Comparison of acute infection of calves exposed to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhoea virus or a HoBi-like virus. *Am. J. Vet. Res.* 74:438–442.
- Ridpath J.F. 2010. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Global Status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26:105-121.
- Santos A.S., Antoniassi N.A.B., Boabaid F.M., Bitencourt A.P.G., Almeida L.L., Canal C.W., Flores E.F. & Driemeier D. 2011. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarréia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 31(10):885-892.
- Schirrneier H., Strebellow G., Depner K., Hoffmann B. & Beer M. 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85:3647-3652.
- Shin T. & Acland H. 2001. Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *J. Vet. Sci.* 2(2):81-84.
- Ståhl K., Kampa J., Alenius S., Persson Wadman A., Baule C., Aiumlamai S., Belák S. 2007. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus-implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.* 38:517–523.
- Ståhl K. & Alenius S. 2012. BVDV control and eradication in Europe —an update. *Jpn. J. Vet. Res.* 60:31-39.
- Stalder H.P., Meier P., Pfaffen G., Wageck-Canal C., Rüfenacht J., Schaller P., Bachofen C., Marti S., Vogt H.R., Peterhans E. 2005. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72: 37–41.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731– 2739.
- Weber M.N., Mósena A.C.S., Simões S.V.D., Almeida L.L., Pessoa C.R.M., Budaszewski R.F., Silva T.R., Ridpath J.F., Riet-Correa F., Driemeier D. & CANAL C.W. 2014. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with 'HoBi'-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* doi:10.1111/tbed.12223.
- Uttenthal A., Grøndahl C., Hoyer M.J., Houe H., van Maanen C., Rasmussen T.B. & Larsen L.E. 2005. Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves: Do we know the reservoirs for BVDV? *Prev. Vet. Med.* 72:87–91.
- Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P. & Paton D.J. 1994. 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.* 136:309–323.

Legenda das Figuras

Fig. 1. Bovino fêmea, 3 meses de idade, positivo para BVDV-3. **(A)**. Espessamento difuso e acentuado da superfície dorsal da língua por material branco amarelado, friável e granular. **(B)**. Observa-se no epitélio superficial da língua degeneração balonosa e formação de vesículas e pústulas. HE, barra = 50µm.

Fig. 2. Árvore filogenética retangular baseada nos fragmentos parciais das sequências de nucleotídeos do gene 5'NCR de membros do gênero *Pestivirus*. A amostra PB22487/12 está destacada com um símbolo (●).

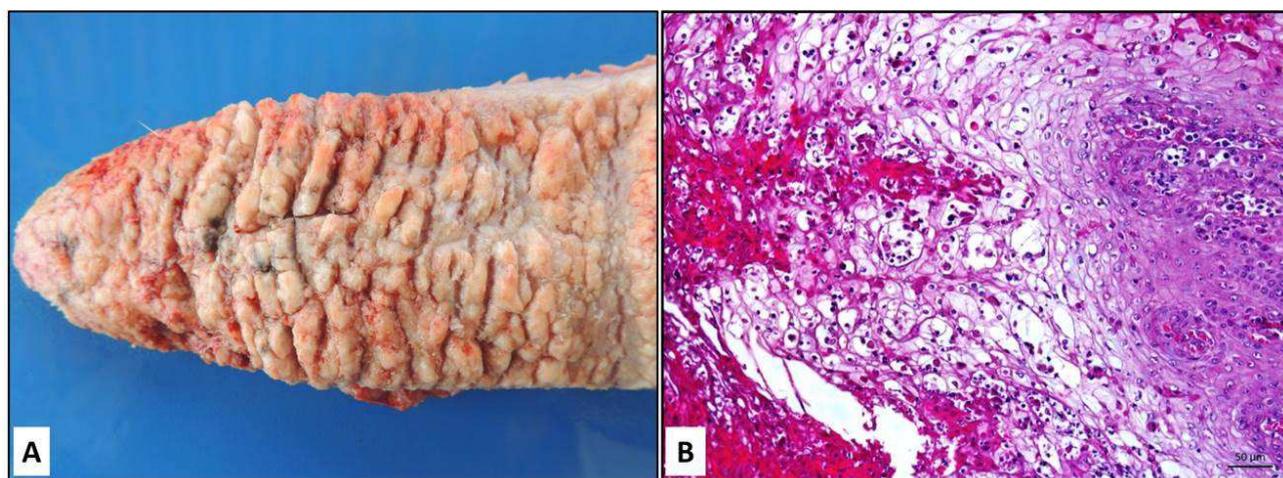


Fig. 1

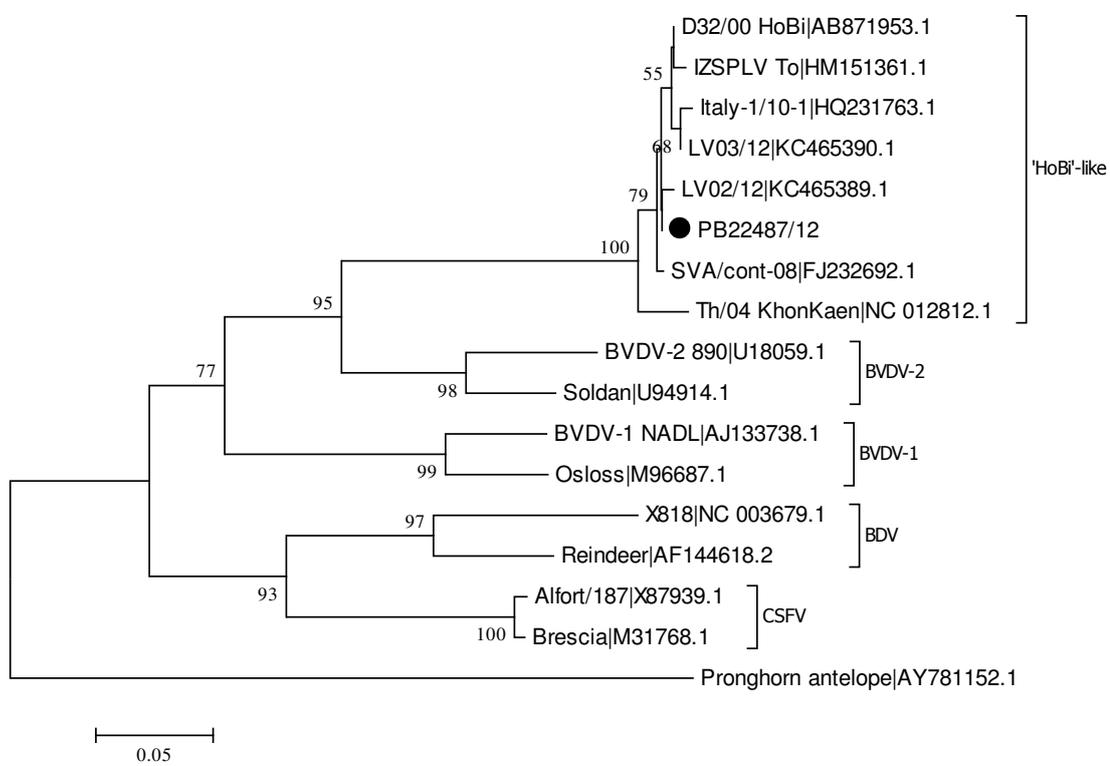


Fig. 2

CAPÍTULO III

Enfermidades digestivas de bovinos da região semiárida do Brasil.

Manuscrito submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira

(Qualis A2)

Enfermidades do Sistema Digestório de bovinos da região semiárida do Brasil^{II}

Ana L.A. Marques², Gildeni M.N. de Aguiar ², Milena A.A. de Lira ², Eldinê Gomes de Miranda Neto², , Sérgio S. Azevedo²*Sara V.D. Simões²

ABSTRACT.- Marques A.L.A., Aguiar G.M.N., Lira M.A.A., Simões S.V.D. & Azevedo S.S. 2016. [**Digestive diseases of cattle from the semiarid of Brazil.**]Enfermidades digestivas de bovinos da região semiárida do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):000-000. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Caixa Postal 61, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: sergio@vps.fmvz.usp.br.

Digestive problems are important causes of diseases in cattle and studies about the frequency of occurrence of them in the semiarid region have not been conducted yet. The aim of this study was to acquire information about the occurrence, clinical -pathological and epidemiological aspects of digestive diseases of cattle treated at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande from January 2000 to December 2014. During the period of survey were attended 1,202 cattle, which were 19.4% (233/1202) diagnosed with digestive disorders. The lethality rate of the diseases was 49.8% (116/233). The traumatic reticulitis and vagal indigestion were common and high lethality disorders engines, which was attributed to the severity of injuries, delay in the clinical care and inaccurate diagnoses. Obstruction to the intake flow, caused by esophageal obstruction, impaction in the rumen, omasum, abomasum and especially intestinal accidents, was a condition often identified with all the cases surpassed the fermentative disorders ruminoreticular cavity. Actinobacillosis, actinomycosis and paratuberculosis were the bacterial infectious diseases diagnosed, the most frequent was actinobacillosis. Viral infectious diseases diagnosed were malignant catarrhal fever, bovine viral diarrhea and mucosal disease. Despite the creation of systems with low capacity and climatic conditions of the region do not favor the survival of gastrointestinal parasites, the parasitic diseases were also important causes of morbidity in young cattle, indicating that they have not been implemented suitable schemes of control for this disease. It was concluded that the information obtained can collaborate with the adoption of effective preventive measures and consistent with the reality observed in the region.

INDEX TERMS: ruminants, diseases, digestive system.

RESUMO.-Os problemas digestivos são importantes causas de afecções em bovinos e estudos sobre a frequência de ocorrência destas na região semiárida ainda não foram realizados. Objetivou-se com este trabalho obter informações sobre a ocorrência, aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos das doenças do sistema digestório de bovinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014. No período do levantamento foram atendidos 1.202 bovinos, sendo 19,4% (233/1202) diagnosticados com enfermidades do sistema digestório. A taxa de letalidade das enfermidades foi 49,8% (116/233). As reticulites traumáticas e a indigestão vagal foram distúrbios motores frequentes e de alta letalidade, sendo esta atribuída à gravidade das lesões, demora no atendimento clínico e imprecisão no diagnóstico. A obstrução ao fluxo da ingesta, ocasionada por obstruções esofágicas, impactações no rúmen, omaso, abomaso e principalmente acidentes intestinais, foi uma condição identificada frequentemente, tendo a totalidade dos casos superado os distúrbios fermentativos da cavidade ruminoreticular.

. Actinobacilose, actinomicose e paratuberculose foram as doenças infecciosas bacterianas diagnosticadas, sendo a actinobacilose a mais frequente. As doenças infecciosas virais diagnosticadas foram a febre catarral maligna, diarréia viral bovina e a doença das mucosas. Apesar dos sistemas de criação com baixa lotação e as condições climáticas da região não favorecerem a sobrevivência de parasitos gastrintestinais, as doenças parasitárias foram também importantes causas de morbidade em bovinos jovens, demonstrando que não estão sendo implantados esquemas de controle adequados para estas enfermidades. Conclui-se que as informações

^{II}Recebido em

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Avenida Universitária, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. * Autor para correspondência: sergio@vps.fmvz.usp.br

obtidas poderão colaborar com a adoção de medidas profiláticas eficazes e condizentes com a realidade observada na região.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ruminantes, afecções, sistema digestório.

INTRODUÇÃO

Os problemas digestivos de bovinos estão entre os principais causas de atendimentos clínicos veterinários e, na sua maioria, relacionados ao inadequado manejo nutricional, seja pelo fornecimento de nutrientes em excesso, observado principalmente em sistemas intensivos de criação, ou devido à escassez de forragens, o que leva os criadores a fornecerem alimentos em quantidade ou qualidade inadequada, predispondo os animais à ocorrência de doenças metabólicas e digestivas (Hansen 2000, Wittek et al. 2007, Lima et al. 2008, Gheller et al. 2010, Burns et al. 2013).

No estado de Pernambuco, na Clínica de Bovinos de Garanhuns-UFRPE, as enfermidades digestivas foram responsáveis por 20% da casuística (Silva Filho et al. 2012), e na região ainda foram publicados outros trabalhos identificando casos de compactação e deslocamento abomasal (Câmara et al 2009, Câmara et al. 2010), dilatação de ceco (Silva et al. 2014), timpanismo espumoso (Coutinho et al. 2009) e obstrução intestinal (Silva Filho et al. 2011). Na região semiárida a frequência de ocorrência e a identificação dos distúrbios digestivos de caprinos e ovinos foram estudados por Lira et al. (2013), porém ainda não foram realizados estudos semelhantes e abrangentes em bovinos.

Estudos retrospectivos baseados na coleta de dados em arquivos são importantes em Medicina Veterinária, pois permitem agrupar dados sobre diferentes enfermidades (Figuera 2008). Neste contexto, considerando que há diversos anos o Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos-PB, estabelece diagnósticos de enfermidade de bovinos procedentes de diversos estados da região Nordeste, objetivou-se com este trabalho obter informações sobre a ocorrência, aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos das doenças digestivas de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido a partir do levantamento de fichas da Clínica Médica de Grandes Animais (CMGA) e do Laboratório de Patologia Animal (LPA) do HV da UFCG, referentes aos atendimentos e necropsias realizados no período de 2000 a 2014. Foram coletados dados referentes a identificação e manejo dos animais, histórico dos casos, sinais clínicos, protocolos de tratamento, achados de necropsias e histopatológicos. Para o diagnóstico de enfermidades que necessitaram de testes sorológicos, isolamento e/ou identificação de agentes que não estavam inclusos na rotina do HV, amostras foram encaminhadas para laboratórios de outras instituições.

As enfermidades diagnosticadas foram inicialmente classificadas em grupos definidos como: distúrbios da cavidade ruminorreticular, doenças infecciosas, doenças intestinais obstrutivas, doenças parasitárias, doenças intestinais inespecíficas, afecções do abomaso, do esôfago e doenças do peritônio (Quadro 1). Posteriormente as enfermidades foram apresentadas individualmente de acordo com a frequência de ocorrência para visualização das mais frequentes (Quadro 2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período do levantamento foram atendidos no Hospital Veterinário 1.202 bovinos, sendo 19,4% (233/1202) diagnosticados com enfermidades do sistema digestório. A taxa de letalidade das enfermidades foi 49,8% (116/233). Os grupos de enfermidades e a frequência de ocorrência de cada uma delas estão apresentados, respectivamente, nos Quadros 1 e 2.

Dentre os distúrbios motores da cavidade ruminorreticular foram diagnosticados casos de reticulites traumáticas, compactação de rúmen e indigestão vaginal. Os principais distúrbios fermentativos identificados foram a indigestão simples, acidose ruminal e timpanismo espumoso. Dentre as afecções do abomaso foram diagnosticados casos de compactações, úlceras e deslocamento. As intussuscepções, as obstruções por fitobezoares, dilatações cecais, compactação e estenose de cólon foram identificadas como causas de doenças intestinais obstrutivas. Casos clínicos em que o principal sinal foi a diarreia, porém sem a etiologia identificada, foram considerados como diarreia sem etiologia.

Conforme demonstrado no Quadro 2 as perfurações do retículo por corpos estranhos pontiagudos foram as doenças digestivas mais frequentes. Dos 43 casos diagnosticados, em três houve o envolvimento apenas do retículo, em nove do retículo e peritônio e em 31 casos do retículo, peritônio e pericárdio. Nos casos de reticulite não houve óbito, sendo a letalidade 77,8% e 100% nos casos de reticuloperitonite e reticulopericardite traumática, respectivamente. Os corpos estranhos metálicos foram encontrados principalmente durante as necropsias e consistiam em grampos de cerca ou pregos e arames com 5 a 20 cm de comprimento.

Em 12 casos foi possível identificar o corpo estranho, em outros, foram encontradas cicatrizes da perfuração, aderências e abscessos. Nem sempre é possível localizar o agente causador da lesão, pois dependendo do tempo de sua ingestão, o corpo estranho pode perfurar, causar a lesão e se desprender, podendo voltar para dentro do retículo, desintegrar-se ou mesmo progredir até ser eliminado do trato intestinal (Baker, Van Dreumel & Palmer 1993). Oliveira et al. (2013) ao estudarem casos de reticulopericardite em abatedouros observaram que 74% dos animais apresentavam perfuração do saco pericárdico e aderências reticulares, porém em somente 34% foi possível a visualização dos corpos estranhos.

As perfurações do retículo por corpo estranho pontiagudo, por estarem entre as doenças mais comuns de bovinos são, há vários anos, enfermidades que preocupam médicos veterinários (Mousavi et al. 2007). Geralmente associa-se a enfermidade ao acesso dos animais a lixões. No entanto, entre os animais acometidos apenas um teve histórico de acesso a lixões, demonstrando que a ingestão dos corpos estranhos pode ter ocorrido nas áreas de pastejo ou durante a ingestão de alimentos fornecidos em cochos de madeira ou borracha com manutenção insatisfatória, sendo a utilização de cochos inadequados uma situação bastante frequente na região.

Considerando as dimensões dos corpos estranhos encontrados pode-se considerar que a sua visualização seria possível no caso de uma fiscalização mais intensa. É necessário que proprietários e tratadores sejam devidamente alertados e adotem outra postura em relação à profilaxia dessas doenças, que deve incluir a limpeza dos currais, busca por corpos estranhos junto aos alimentos fornecidos em cochos e a manutenção das cercas e dos cochos de madeiras e de pneus que são frequentemente utilizados na região.

A alta letalidade observada nos casos de reticuloperitonite e reticulopericardite foi atribuída à gravidade das lesões, demora no atendimento clínico e imprecisão no diagnóstico. A conclusão de que houve demora no atendimento e imprecisão no diagnóstico foi obtida durante avaliação do histórico dos casos, pois em 41,9% (18/43) destes havia relatos de que os animais foram previamente diagnosticados como portadores de outras enfermidades como indigestões simples, tristeza parasitária ou hipocalcemia. Após o estabelecimento inicial destes diagnósticos os animais foram submetidos a tratamentos nas propriedades e houve remissão parcial dos sinais, porém posteriormente voltaram a adoecer. É provável que os primeiros sinais dos animais já estivessem relacionados à reticulite traumática, porém não foram prontamente realizados os procedimentos de laparorruminotomia exploratória, medida diagnóstica e terapêutica mais adequada aos casos. Nos três casos diagnosticados como reticulite houve recuperação dos animais, sendo possível identificar, durante laparorruminotomia, que não havia presença de aderências na cavidade, sendo o corpo estranho identificado e retirado do retículo antes que causasse maiores danos. Nos nove animais, em que o envolvimento do peritônio foi identificado também durante exploração da cavidade abdominal, sendo por isso classificados como retículo-peritonite traumática, o histórico do caso demonstrava que houve demora entre o início dos sinais clínicos e a realização do procedimento cirúrgico.

Após as perfurações do retículo por corpo estranho pontiagudo, a indigestão vaginal (IV) foi o distúrbio motor diagnosticado com maior frequência. Os diagnósticos dos casos foram concluídos após a identificação de sinais clínicos sugestivos da enfermidade e identificação de aderências durante realização de laparotomias ou necropsias. As aderências estavam localizadas entre diversos órgãos e estruturas como retículo e diafragma, omaso e diafragma, baço e retículo, abomaso e peritônio, sugerindo que o quadro foi desencadeado pelo envolvimento de ramos do nervo vago nestes processos inflamatórios ou mesmo pela presença da aderência sem necessariamente a lesão do nervo. Segundo Radostits et al. (2002) as aderências por si só podem causar a diminuição mecânica da motilidade reticular, causando desequilíbrio entre o tempo de retenção das partículas e o seu fluxo no complexo ruminorreticular, alterando o trânsito normal dos alimentos.

Em dois casos de IV foi identificado corpo estranho perfurante na área de aderência situada entre omaso, retículo e diafragma, e outro posicionado na região pilórica, além da presença de um abscesso entre o abomaso e retículo, demonstrando a associação existente entre a reticulopericardite traumática e a IV. De acordo com Rehage et al. (1995) as reticulopericardites traumáticas são consideradas as enfermidades que mais predisõem a lesões que originam a indigestão vaginal. A comprovação da associação entre abscessos e aderências na cavidade abdominal, decorrentes de reticulites traumáticas, reforça a importância da realização de intenso trabalho de divulgação das medidas profiláticas e precisão no diagnóstico das perfurações do retículo por corpo estranho pontiagudo..

Os sinais clínicos identificados nos animais com IV variavam, em decorrência da estenose funcional ser anterior ou posterior. Porém a perda de estratificação ruminal, anorexia e desidratação de moderada a grave, puderam ser observados em todos os casos. A prova de atropina foi positiva em todos os animais que apresentavam bradicardia, sendo a hipermotilidade ruminal frequentemente identificada nos animais bradicárdicos. A elevação dos níveis de cloreto no suco ruminal era frequente nos casos em que também era confirmada a compactação abomasal, identificada através da palpação de abomaso distendido e firme em laparoruminotomia exploratória.. Um dos animais apresentou tosse associada à regurgitação em jatos do conteúdo ruminal, e durante laparoruminotomia foi observada ausência de tônus no orifício retículo-omasal, além do aumento de volume do omaso, que ainda estava firme (sem deixar impressão digital) sugerindo estar compactado. De acordo com Radostits et al. (2002) a compactação do omaso ocorre esporadicamente como parte da síndrome da indigestão vaginal, mas sua causa é incerta.

Os casos de compactações ruminais ocorreram em fêmeas com idade entre dois e sete anos de idade e estiveram associados à ingestão de forragens maduras e com baixos níveis de energia e proteína, a exemplo do capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Devido à baixa qualidade das forragens que eram fornecidas moídas e misturadas com farelos, como forma de melhorar a palatabilidade, o que ocasionava a ingestão de grandes quantidades e seu acúmulo na cavidade ruminoreticular. Dietas de má qualidade comprometem a capacidade fermentativa da microbiota ruminal, levando ao acúmulo de alimento nos pré-estômagos e obstrução da luz visceral, impossibilitando a progressão da ingesta, que se transforma em uma massa compacta de material indigerível (Mitchell 1991, Radostits et al. 2002, Garry 2006). Os sinais clínicos mais observados foram hiporexia ou anorexia, hipomotilidade ruminal, parada da ruminação, distensão abdominal, desidratação, redução da quantidade de fezes e aumento da frequência cardíaca. Os animais foram tratados durante 5 dias com laxantes (purgante salino, suco de mandacará (*Cereus jamacaru*), fluidoterapia oral, 10 litros diários de suco de rúmen e responderam de forma satisfatória ao tratamento.

A indigestão simples foi o distúrbio fermentativo diagnosticado mais frequentemente, estando na maioria dos casos associada à modificação brusca na alimentação, conforme referenciado por Fraser et al. (1996). Dentre os alimentos ofertados aos animais que apresentaram a enfermidade havia restos de comida caseira, frutas, palha de feijão e casca de mandioca. O fornecimento excessivo de concentrado aliado à ausência de forragens de boa qualidade também foi associado a casos de indigestão. Os sinais clínicos relatados mais comumente foram apatia, anorexia, distensão abdominal, parada da ruminação e fezes pastosas. Os animais que não se recuperaram espontaneamente, o que normalmente ocorre nos casos de indigestão simples, responderam satisfatoriamente aos tratamentos instituídos que incluíram a retirada imediata do alimento suspeito ou ajustes no fornecimento, uso de laxantes, restabelecimento do equilíbrio hidroeletrólítico, transfaunações e fornecimento de volumosos de boa qualidade. Em um dos casos houve a necessidade de intervenção cirúrgica (ruminotomia), apesar de ser um caso de indigestão simples, pois houve a ingestão da placenta pela vaca. Nas avaliações do suco de rúmen foi possível observar que a maioria dos animais apresentou inatividade da flora ruminal e pH alcalino, cujo valor elevado justifica-se pela anorexia e a contínua produção de saliva.

A acidose ruminal e o timpanismo espumoso foram outros distúrbios fermentativos identificados, porém com ocorrência bem menor quando comparados aos casos de indigestão simples. Em outras regiões do Nordeste, a exemplo do município de Garanhuns, Estado de Pernambuco, onde há grandes bacias leiteiras e consequentemente o manejo nutricional dos animais é mais intensificado que o observado na região deste estudo, a acidose pode representar até 10% dos casos de distúrbios digestivos atendidos pelos veterinários (Afonso & Mendonça 2000). Estes resultados demonstram a forte associação entre os tipos de distúrbios digestivos encontrados e o manejo alimentar ao qual os animais são submetidos nas diferentes regiões.

As compactações abomasais foram diagnosticadas em oito animais. Dois desses apresentaram também compactação do omaso. Os animais acometidos tinham entre um e dez anos de idade, cinco fêmeas e três machos, criados sob regime extensivo e semi-intensivo, com alimentação baseada em pasto nativo, capim braquiária, capim elefante moído, capim andrequice, rolão de milho, farelo de milho e trigo e cama de frango. Todos os casos ocorreram no período da seca, quando as forragens estão secas, com alto teor de lignina e há

pouca disponibilidade de água, semelhante ao relatado por Borges et al. (2007). Câmara et al. (2009), em outro estudo constatou que de 14 casos da enfermidade, 71,4% ocorreram na estação da seca. Segundo Blikslager et al. (1995), a ingestão de grandes quantidades de forragem de baixa qualidade e a ingestão inadequada de água são as principais causas de compactação do abomaso. No Brasil, a principal causa é a ingestão de forrageiras trituradas e ricas em lignina, seguida pela ingestão de cama de frango e palha de arroz (Moscardini & Borges 2007).

Na avaliação do suco ruminal dos animais suspeitos de compactação abomasal, em seis animais, foi identificada elevação do teor de cloreto, acima de 30 mEq/dL, em todos os animais, de maneira que pode-se fazer conclusões sobre a existência de refluxo abomasorruminal, que geralmente ocorre quando há obstruções na passagem da ingesta do abomaso para o intestino (Dirksen 1993). **O fato de, durante realização de laparoruminotomia nos animais suspeitos de compactação abomasal, não terem sido identificadas aderências na cavidade abdominal, que poderia levar a suposição de uma compactação abomasal secundária a lesão de vago, conduziu ao estabelecimento de diagnóstico presuntivo de indigestão abomasal primária ou dietética.** Dois animais, um com 12 meses e outro com três anos, possuíam histórico de distúrbios digestivos desde os oito meses e ao exame físico foi possível identificar que apresentavam distensão abdominal, perda de peso e hipermotilidade ruminal. Os animais morreram e o principal achado de necropsia foi a presença de grande quantidade de areia no abomaso. De acordo com Radostits et al. (2002) quando grande quantidade de areia é ingerida, o omaso, abomaso, intestino grosso e ceco podem tornar-se compactados. As deficiências nutricionais em bovinos aliadas à baixa seletividade dessa espécie os levam a desenvolver aberrações no apetite levando-os a ingerir corpos estranhos como madeira, pedras, areia, dentre outros (Martins et al. 2004).

As intussuscepções foram a principal causa de obstruções no fluxo da ingesta, sendo responsável por 28,6% (12/42) dos casos de obstrução, estando também associada a maior letalidade. Silva Filho et al. (2010) ao estudarem casos de intussuscepção em bovinos no Pernambuco, identificaram um percentual semelhante de casos (26,67%). A maioria dos casos de intussuscepção, 66,7% (8/12), ocorreu em animais adultos, e dentre os jovens nenhum apresentou sinais de enterite ou de intenso parasitismo durante os exames e necropsias realizadas, situações consideradas como fatores de risco para as intussuscepções (Constable et al. 1997). A faixa etária dos jovens acometidos variou em torno de 3 a 6 meses. Alguns autores consideram que as intussuscepções são mais comuns em bovinos com idade inferior a 2 meses (Marques et al. 2001), porém também há registros de que não há predisposição etária para esta afecção (Pearson 1971).

De acordo com informações obtidas junto aos proprietários, um dos animais apresentou os sinais clínicos após a introdução da palma forrageira (*Opuntia* sp.) na dieta. O pastejo em área com sisal (*Agave sisalana*) também foi associado ao início dos sinais clínicos em outro animal. No Nordeste o bagaço do sisal é aproveitado para alimentação animal em épocas de seca prolongada e também tem sido relacionado a compactação ruminal e/ou formação de fitobezoares em bovinos, por conter muita fibra e ser de baixa digestibilidade (Riet-Correa et al. 2011).

Os fitobezoares, por sua vez, foram a segunda maior causa de obstrução intestinal, com seis casos. Apenas em 4 animais foi relatado o segmento intestinal em que houve a obstrução, sendo três no duodeno e um no jejuno. Segundo Afonso & Costa (2007) a obstrução causada por fitobezoares ocorre quase sempre em algum segmento do duodeno ou jejuno, causando a diminuição da motilidade gastrointestinal e reduzindo a quantidade de fezes. Esta condição provoca inclusive distensão dos pré-estômagos e abomaso devido ao refluxo do conteúdo gastrointestinal. No estudo observou-se apatia, anorexia, ausência de ruminação e de fezes, ou quando havia fezes eram escuras e fétidas além de cólica e distensão abdominal, achados esses que também estão de acordo com o relatado na literatura (Dirksen 1993).

Pelo menos a metade dos animais acometidos passou a apresentar os sinais clínicos após começarem a consumir capim seco, agave e palma. Em um estudo retrospectivo no Estado de Pernambuco, 16 casos de fitobezoares estiveram relacionados à palma forrageira (*Opuntia ficusindica*) presente na dieta de todos os animais acometidos, cuja evolução ocorreu de forma aguda (Afonso et al. 2008). Na região é comum a oferta de gramíneas e alimentos compostos por fibra de baixa digestibilidade como alternativa em épocas de seca associada à falta de água a vontade para os animais, condição favorável ao aparecimento desse tipo de obstrução. Dentre os animais acometidos somente um era jovem e apresentava uma obstrução associada à presença de enterólito.

Outras formas de obstruções intestinais observadas foram as torções (4 casos), dilatação de ceco (2 casos), compactação (3 casos) e estenose (1 caso) de cólon. Nos casos de torção apenas um animal era jovem - 4 meses- e dentre os segmentos envolvidos estavam o ceco de um animal que também apresentou compactação do omaso, cólon e porção do intestino delgado. Em bovinos adultos acredita-se que quando há o envolvimento do ceco, a sua dilatação precede o vólculo e a torção cuja patogenia tem como principal fator a alimentação rica

em carboidratos, que quando não são completamente fermentados no rúmen, o são de forma excessiva no ceco, resultando em elevação da concentração dos ácidos graxos voláteis, que por sua vez, provocam a queda do pH do conteúdo cecal, causando hipotonia ou atonia, acúmulo da ingesta e gás no órgão com a consequente dilatação, deslocamento e/ou retroflexão e, em alguns casos, torção (Afonso et al. 2002, Steiner 2004, Murray & Smith 2006, Radostits et al. 2002, Silva et al. 2014).

As obstruções intestinais de uma maneira geral não são tão comuns quanto as desordens dos pré-estômagos e abomaso (Rebhum 2000), porém os dados deste estudo demonstram que elas são a terceira causa de transtornos digestivos, superando as afecções do abomaso e os distúrbios fermentativos da cavidade ruminorreticular. Dessa forma, elas devem ser consideradas no estabelecimento do diagnóstico diferencial dos transtornos digestivos na região semiárida do Brasil, onde observa-se frequentemente no histórico desses animais o registro de fornecimento de dietas de baixa digestibilidade.

A actinobacilose, actinomiose e a paratuberculose foram as doenças infecciosas bacterianas diagnosticadas, sendo a actinobacilose a mais prevalente. A maioria dos animais com actinobacilose era criada em regime extensivo, alimentava-se de pasto nativo e tinha idade muito variável (entre um e 13 anos). O período de maior ocorrência da enfermidade foi entre os meses de maio a janeiro (11/16). Um dos animais apresentou a forma clássica da enfermidade, sendo observada glossite difusa e protrusão da língua. Os outros apresentaram a forma atípica, sendo identificados granulomas na mandíbula, narinas e lábio, além de linfadenite envolvendo principalmente os linfonodos retrofaríngeos, parotídeos e submandibulares.

A actinomiose, osteomielite causada pelo *Actinomyces bovis*, cuja lesão clássica é localizada na mandíbula e, mais raramente, na maxila (Thompson 2007), ocorreu de forma menos frequente que a actinobacilose, acometendo apenas sete bovinos com idade entre três e oito anos. O curso clínico desta enfermidade variou entre oito dias e seis meses e os sinais clínicos observados foram aumentos de volumes na face e região mandibular de consistência firme, imóveis, sensíveis e quentes à palpação, em alguns casos drenando secreção purulenta de odor fétido. Era comum aos animais doentes o aumento dos linfonodos submandibulares e parotídeos.

O tratamento de ambas as afecções consistiu na drenagem dos abscessos, quando possível, seguida de sua cauterização com iodo, aplicações de iodeto de sódio por via endovenosa (70 mg/kg), anti-inflamatório e antibiótico. Os animais diagnosticados com actinobacilose responderam de forma mais satisfatória ao tratamento instituído, quando comparados aos com actinomiose. Dois animais com actinomiose tiveram indicação de abate devido a extensão e cronicidade da lesão. A ocorrência de actinobacilose e actinomiose foi observada em outros estudos referentes a enfermidades de bovinos realizados no Brasil (Andreazza et al. 2013, Lucena et al. 2010) demonstrando que a enfermidade é frequente nos rebanhos brasileiros, havendo inclusive relatos de surtos de actinobacilose (Mandadori et al. 1994, Loss et al. 2006). Durante o período do estudo não houve registros de surtos dessas enfermidades, porém observou-se que a actinobacilose ocorre de maneira relativamente frequente na região, condição provavelmente associada à ingestão de forragens grosseiras existentes no semiárido, podendo ocasionar lesões que são portas de entrada para os agentes causadores das enfermidades (Méndez & Riet-Correa 2007).

Durante o período de levantamento foram diagnosticados quatro casos de paratuberculose, enfermidade que tem como agente etiológico o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) que ocasiona uma enterite granulomatosa. Os casos foram diagnosticados entre 2007 e 2014, não havendo registro da enfermidade em anos anteriores. Dois dos animais apresentaram os sinais característicos da enfermidade como diarreia, emagrecimento progressivo, diminuição do apetite e desidratação. Os diagnósticos foram confirmados através da identificação de lesões macroscópicas e histológicas, destacando-se espessamento da mucosa do intestino delgado com áreas irregulares e enrugadas, com presença de fluido de aspecto leitoso entre as dobras da mucosa, congestão e hipertrofia das placas de Payer e linfonodos mesentéricos. Presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos com formação de numerosas células gigantes de Langhans na mucosa intestinal e linfonodos mesentéricos. Em um animal foi possível detectar a presença de grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes no intestino e linfonodo mesentérico, resultando positivo na técnica de Ziehl-Nielsen. Levantamentos sorológicos através da técnica de ELISA, realizados nos rebanhos de duas das propriedades onde ocorreram os casos clínicos de paratuberculose, identificaram alta frequência de animais sorologicamente positivos (70,6%). Um estudo sorológico realizado em 31 fazendas da região também identificou, em fazendas sem histórico da doença, a presença de anticorpos em animais de 21 destas, com frequência média de 10,8% (Medeiros et al. 2012). Yamasaki et al. (2013) demonstrou que a paratuberculose está presente em 11 estados brasileiros, distribuídos nas cinco regiões do país, principalmente em rebanhos bovinos leiteiros. Na Paraíba, foi realizado um estudo da prevalência da paratuberculose nas mesorregiões do estado, em 480 rebanhos, onde encontrou-se uma prevalência de 34,5%, e dentre 2504 animais amostrados, 10,7% foram soropositivos (Vilar et al. 2015).

A ocorrência de casos clínicos e os resultados dos exames sorológicos realizados no estado da Paraíba demonstram que a enfermidade é importante na região e que o Map está disseminado nos rebanhos causando prejuízos econômicos. Além disso, é preocupante o fato da possibilidade do agente estar envolvido com a doença de Crohn em humanos (Slana et al. 2009), uma vez que o Map foi detectado em pacientes com a enfermidade (Naser et al. 2004). A situação torna-se ainda mais preocupante considerando a dificuldade relacionada ao diagnóstico da enfermidade, pois o cultivo bacteriano é um método impraticável para fins de diagnóstico devido ao prolongado período de tempo necessário para isolamento do agente (Behr & Collins 2010, Timms et al. 2011) e a baixa sensibilidade do isolamento para o diagnóstico individual (Medeiros et al. 2012). Estudos recentes constataram que a PCR pode produzir resultados rápidos, inclusive para análise de “pools” de amostras para estimar a situação da infecção em um rebanho, podendo ser utilizado como diagnóstico rotineiro da paratuberculose (Yamasaki et al. 2013).

A doença infecciosa viral diagnosticada com maior frequência foi a febre catarral maligna (FCM), enfermidade causada por um *Rhadinovirus* da família Gammaherpesvirinae, caracterizada por linfoproliferação, inflamação e ulceração das mucosas e vasculite necrosante fibrinóide (Radostits et al. 2002, Smith 2006). Nove dos 10 casos diagnosticados apresentaram os sinais da forma cefálica ocular que incluíram anorexia, agalactia, febre, letargia, opacidade de córnea, ceratoconjuntivite, secreção ocular bilateral, fotofobia, secreção nasal purulenta, salivação e lesões erosivas nas mucosas nasal e oral. Além desses sinais, um animal apresentou hematúria e três apresentaram edema nos membros. Os sinais clínicos foram semelhantes aos registrados na literatura (Radostits et al. 2002, Smith 2006, Rech et al. 2005, Lemos et al. 2005).

Os diagnósticos de FCM foram baseados nos sinais clínicos, achados de necropsia ou histopatologia, onde foi identificada a vasculite linfocitoplasmocítica generalizada, considerada uma lesão patognomônica ou muito característica para a doença (Brown, Baker & Barker 2006). Os casos geralmente ocorrem de forma esporádica na região, porém há registro de um surto com alta morbidade e letalidade no início da década de 90 descrito por Macedo et al. (2007) que também relataram os casos de FCM que ocorreram entre os anos de 2000 a 2005 no HV da UFCG.

A taxa de letalidade da FCM foi de 90% (9/10), um animal da raça Sindi, com um ano de idade, após um curso clínico de 40 dias teve remissão dos sinais e o proprietário optou por sua retirada do HV. Rech et al (2005) ao estudarem surtos e casos esporádicos da doença no Rio Grande do Sul, observaram taxas de letalidade de 100% em 93,3% das propriedades estudadas. Em apenas uma, onde a doença ocorreu em forma de surto, três bovinos afetados sobreviveram, sendo a taxa de letalidade 83,3%, indicando que a FCM em bovinos nem sempre é fatal, havendo inclusive a possibilidade de retificação do diagnóstico de FCM, caso houvesse a recuperação do bovino afetado. Ainda para estes autores, através de novas técnicas moleculares de diagnóstico, como a PCR, foi possível estabelecer que bovinos recuperados de FCM e portadores crônicos do vírus não são incomuns e que dentre as sequelas da doença está a arteriopatia obliterante crônica (O'Toole et al. 1995, O'Toole et al. 1997, Otter et al. 2002).

Embora a epidemiologia da enfermidade no semiárido não tenha sido estabelecida, um fator de risco importante para a doença é a criação conjunta de bovinos e ovinos, que é uma característica dos sistemas de produção das propriedades da região. Porém, a enfermidade pode ocorrer também em rebanhos em que não há criação conjunta dessas duas espécies (Radostits et al. 2002; Smith 2006).

Uma outra enfermidade viral diagnosticada na região foi a Diarréia Viral Bovina. A identificação de sete animais com sinais clínicos da infecção pelo vírus da diarreia bovina e a comprovação em quatro destes, através de imuno-histoquímica, RT-PCR, vírus neutralização e/ou o próprio isolamento viral confirma a presença do agente na região. Nos outros três animais não foram realizados exames para comprovação da infecção viral, porém os sinais clínicos e patológicos eram sugestivos de doença das mucosas. Dois dos quatro animais comprovadamente infectados apresentaram sinais clínicos e achados patológicos característicos da doença das mucosas. Os principais sinais clínicos identificados foram hipertrofia de linfonodos pré-escapulares e pré-cruais, perda de peso progressiva, ulcerações na cavidade oral, na vulva e no reto, diarreia sanguinolenta, secreção nasal sero-mucoide bilateral, ceratoconjuntivite, dermatite generalizada com presença de crostas e desprendimento de pelo, erosões nos cascos com aumento da linha coronária e presença de crostas no boleto. Os achados patológicos mais comuns foram a presença de múltiplas erosões de tamanhos variados desde a mucosa oral até o abomaso, por vezes recobertas com conteúdo purulento. No esôfago algumas úlceras apresentavam-se lineares, em formato de arranhadura. Havia ainda atrofia de papilas bucais e ruminais, hiperplasia intestinal com evidenciação das placas de Payer.

A presença de animais comprovadamente acometidos com a doença das mucosas é preocupante, pois esses animais são persistentemente infectados com o vírus e tem importância considerável na disseminação do agente para os demais animais do rebanho (Fulton et al. 2005). Os primeiros animais com sinais sugestivos da enfermidade foram atendidos no ano de 2007, demonstrando que o vírus pode estar se disseminando já há

alguns anos. No estado da Paraíba, o primeiro levantamento sorológico realizado identificou a presença de 22% de animais sorologicamente positivos em um total de 2343 animais testados (Thompson et al. 2006). Um estudo transversal com amostragem planejada de 2443 animais de um total de 478 rebanhos, entre os anos de 2012 e 2013, também foi realizado em todo o Estado da Paraíba, obtendo-se prevalência de 65,5% de propriedades com pelo menos um animal soropositivo e 39,1% de animais soropositivos (Fernandes et al. 2016). Weber et al. (2014) isolaram um vírus muito semelhante ao “HoBi-like” em surto de doença respiratória no Município de Pombal, localizado no Sertão Paraibano. Ainda neste trabalho, a avaliação sorológica do rebanho através do ELISA-Ab detectou que 111 dos 123 animais testados apresentaram anticorpos contra o BVDV.

As doenças parasitárias foram importantes causas de morbidade em bovinos jovens, sendo identificados 22 casos em animais com idade entre 3 e 18 meses, através de exames coproparasitológicos e que tinham regimes de criação extensivo e semi-intensivo. A maioria dos animais com altas cargas parasitárias tinha idade próxima a um ano. Segundo Repposi Junior et al. (2006), a faixa etária de infecções por parasitos gastrintestinais está entre 1 e 18 meses, e há resistência às parasitoses gastrointestinais em bovinos maiores de 2 anos (Costa et al. 1974, Charles 1992, Lima 1998, Pimentel Neto & Fonseca 1999). Apesar das características da criação desses animais no semi-árido, com baixa lotação, e as condições climáticas da região não favorecerem a sobrevivência dos parasitos (Costa, Simões & Riet-Correa 2009), os resultados demonstram que a enfermidade é uma importante causa de morbidade em animais jovens, tendo taxa de letalidade de 27,3 %. A análise das fichas clínicas dos animais demonstrou que 72,7% (16/22) destes tinham sido vermifugados, porém na maioria dos casos as vermifugações ocorreram após a manifestação dos sinais clínicos, demonstrando que o manejo antiparasitário nas propriedades é insatisfatório, pois as perdas produtivas se iniciam antes dos animais apresentarem os sinais clínicos. Delgado et al. (2009) observaram, em estudo no estado de Minas Gerais, que o critério mais frequentemente utilizado pelos proprietários, para definir o momento de utilização de anti-helmínticos em bovinos, era o início dos sinais clínicos.”

A maioria (14/22) dos casos de verminose atendidos na CMGA ocorreu entre o final do período chuvoso e início do período seco, fato este semelhante ao relatado por Costa, Simões & Riet-Correa (2009) que observaram maior frequência de surtos de parasitoses gastrointestinais em caprinos e ovinos entre os meses de maio e agosto, sugerindo inclusive a realização de tratamentos anti-helmínticos, antes desse período crítico, pois essa medida poderia evitar surtos devido à contaminação crescente das pastagens durante o período de chuvas. Todos os demais casos ocorreram no final do período seco, o que pode estar relacionado a aspectos nutricionais. Uma adequada nutrição energética e proteica aumenta a resistência dos animais às infecções parasitárias, portanto, é importante suplementar o rebanho em períodos de escassez alimentar afim de diminuir o grau de infecção (Torres-Acosta & Hoste 2008).

Em estudo no RS sobre as principais afecções de bovinos necropsiados com até um ano de idade, Assis-Brasil et al. (2013) observaram que a partir dos seis meses as parasitoses por nematódeos gastrintestinais foram as principais enfermidades do trato digestivo, o que pode ser atribuído ao desmame, uma vez que os bovinos são mais susceptíveis às parasitoses nessa fase, e que na região estudada é realizado frequentemente nesta faixa etária. Considerando que as condições climáticas da região do estudo, na maior parte dos meses do ano, não são favoráveis aos parasitos, as helmintoses gastrintestinais não deveriam ser um problema. A ocorrência dos casos clínicos demonstra que não estão sendo implantados esquemas de controle adequados para os bovinos jovens. O desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro está associado principalmente a uma resposta prévia contra o parasito, que se torna efetiva ao redor de 18 a 24 meses. Assim, a partir dessa faixa etária, a tendência é ocorrer redução na carga parasitária, diminuição no número de ovos excretados nas fezes e baixa incidência de casos clínicos de verminose (Bresciani et al. 2001).

Dos 22 animais acometidos, somente 16 tinham anexados em seus registros exames coproparasitológicos. Em 87,5% (14/16) das amostras fecais foram encontrados ovos da superfamília Trichostrongylidae, com valor médio de 9.203 ovos por grama de fezes (OPG). Ovos dos gêneros *Strongyloides* foram identificados em 25% (4/16) das amostras, com média de 3.450 OPG. Em 12,5 % (2/16) das amostras foram também identificados ovos do gênero *Trichuris*, com valor médio de 75 OPG. A média das cargas parasitárias dos animais jovens, que são os mais suscetíveis, foi de 11.428 OPG de *Trichostrongylideos*, havendo sido identificados animais com até 24.000 OPG. Os resultados demonstraram que há um alto grau de infestação no ambiente e é necessário estabelecer um adequado programa de controle de parasitoses gastrintestinais nos rebanhos da região. *Eimeria* foi também identificada em 62,5% (10/16) das amostras com média de 6.890 OPG.

As afecções esofágicas foram caracterizadas por obstruções (8/10) e lacerações (2/10). Quatro animais apresentaram obstrução pela ingestão da semente (caroço) de manga (*Mangifera indica*), uma fruta muito comum na região. Também ocasionou laceração no esôfago de um animal. A laceração esofágica também ocorreu devido a ingestão de um galho de juazeiro (*Ziziphus joazeiro*). O alto número destas afecções está relacionado ao hábito alimentar dos bovinos, que consomem grandes quantidades de alimentos de forma rápida

e com baixa seletividade, sendo dentre os ruminantes a espécie mais susceptível, seguida da ovina e caprina (Borges et al. 2007). Segundo Souza et al. (2011), no Brasil, as causas mais comuns de obstrução de esôfago são as frutas (manga, laranja, jaca, abacate), os tubérculos (mandioca, batata, macaxeira) e sobras de produtos hortifrutigranjeiros. Quando as obstruções ocorrem devido a ingestão de frutas observa-se que estão relacionadas àquelas produzidas na região e à ocorrência das safras. Em estudo realizado por (Souza et al., 2011), na região de Garanhuns- PE, foi possível identificar que 80% dos casos ocorreram no período de safra das frutas. Além dos processos obstrutivos decorrentes de obstrução da luz do esôfago foram também identificadas obstruções por compressão extraluminal, resultante de abscesso na região do terço médio do pescoço. Essas compressões podem estar relacionadas a afecções que cursam com aumento dos linfonodos ou traumatismos que causam abscessos.

CONCLUSÃO

Os distúrbios motores da cavidade rumino reticular, seguido das obstruções intestinais e das doenças infecciosas digestivas são os mais frequentes problemas digestivos de bovinos na região semiárida do Brasil. A ingestão de corpos estranhos é um dos mais graves problemas, associado ao tipo de alimento fornecido aos animais. Tais distúrbios, portanto, devem ser considerados nos diagnósticos diferenciais das enfermidades do trato digestivo na região. Além disso, medidas de controle e profilaxia de enfermidades infectocontagiosas como a diarreia viral bovina e a paratuberculose precisam ser divulgadas, pela possibilidade de disseminação destas nos rebanhos da região.

REFERÊNCIAS

- Afonso J.A.B. & Mendonça C.L. 2000. Distúrbios digestivos dos ruminantes. Anais do V Encontro de Médicos Veterinários e Zootecnistas no Nordeste (Enconvet),Aracaju/SE. (Resumo expandido).
- Afonso J.A.B., Mendonça C.L., Costa N.A., Souza M.I., Simão L.C.V. & Dantas F.R. 2002. Alterações clínicas e laboratoriais na dilatação do ceco em bovinos: análise de 10 casos. Rev. Ed. Cont. 3 (5): 313-320.
- Afonso J.A.B., Pereira A.L.L., Vieira A.C.S., Mendonça C.L., Costa N.A. & Souza M.I. 2008. Alterações clínicas e laboratoriais na obstrução gastrointestinal por fitobezoários em bovinos. Rev. Bras. Saúde Prod. An. 9(1): 91-102.
- Afonso J.A.B. & Costa N.A. 2007. Obstrução intestinal em bovinos,p. 370-375.In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Lemos, R.A.A.; Borges, J.R.J. Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol 2. 3ª ed.Santa Maria: Pallotti. 392 p.
- Andreazza D., Wouters A.T.B., Watanabe T.T.N., Boabaid F.M., Wouters F., Souza F.S., Souza S.O. & Driemeier D. 2013. Caracterização patológica e imuno-histoquímica das lesões de actinobacilose em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 33(3):305-309.
- Assis-Brasil N.D., Marcolongo-Pereira M., Hinnah F.L., Ladeira S.R.L., Sallis E.S.V., Grecco, F.B. & Schild A.L. 2013. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 33(4):423-430.
- Baker I.K., Van Dreumel A.A. & Palmer N. 1993. The alimentary system, p.163-173. In: Jubb K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer N. (ed.) Pathology of Domestic Animals. Vol. 2. 5th ed. Academic Press, San Diego. 747p.
- Behr M.A. & Collins D.M. 2010. Paratuberculosis: Organism, disease, control. CAB international, Cambridge. 375p.
- Blikslager A.T., Anderson K.L., Bristol D.G., Fubini S.L. & Anderson D.E. 1995. Abomasal impactation in cattle. J. Am. Vet. Assoc. 15: 571-573.
- Borges J.R.J., Cunha P.H.J., Moscardini A.R.C., Tortelly R., Franco G.L.,Silva . 2007. Compactação de abomaso em bovinos leiteiros: descrição de cinco casos. Ciên. Anim. Bras. 8(4): 857-862.

- Bresciani K. D. S., Nascimento A.A., Costa A.J., Amarante A.F.T. & Perri S.H.V., Lima L.G.F. 2001. Frequência e intensidade parasitária de helmintos gastrintestinais em bovinos abatidos em frigorífico da região noroeste do Estado de São Paulo, SP, Brasil. *Sem. Ciên. Agr.* 22(1): 93-97.
- Brown C.C., Baker D.C. & Barker I.K. 2006. Alimentary system. p.1- 296. In: Jubb K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 2. 5th ed. Academic Press, San Diego. 747p.
- Burns L.V., Helayel M.A., Silva M.A.G., Maruo V.M., Córdova F.M., Silva S.L., Barros C.S. L. & Ramos, A.T. 2013. Doenças de animais de produção na região centro-norte do Estado de Tocantins: 85 casos. *Arq. Pesq. Anim.* 2(1): 01-06.
- Câmara A.C.L., Afonso J.A.B., Costa N.A., Mendonça C.L. & Souza M.I. 2009. Compactação primária do abomaso em 14 bovinos no Estado de Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5):387-394.
- Câmara A.C.L., Afonso J.A.B., Costa N.A., Mendonça C.L., Souza M.I. & Borges J.R.J. 2010. Fatores de risco, achados clínicos, laboratoriais e avaliação terapêutica em 36 bovinos com deslocamento de abomaso. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):453-464.
- Charles T.P. 1992. Verminoses dos bovinos de leite, p.55-110. In: Charles T.P. & Furlong J. (Eds), *Doenças Parasitárias dos Bovinos de Leite*. Embrapa-CPGL, Coronel Pacheco, MG.
- Constable P.D., St Jean G., Hull B.L., Rings D.M., Morin D.E. & Nelson D.R. 1997. Intussusception in cattle: 336 cases (1964–1993). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210:531–536.
- Costa H.M.A., Guimarães M.P., Costa J.O. & Freitas M.G. 1974. Variação estacional da intensidade de infecção por helmintos parasitos de bezerros em algumas áreas de produção leiteira em Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet.* 26(1):143-153.
- Costa V.M.M., Simões S.V.D., Riet-Correa F. 2009. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.* 29(7):563-568.
- Coutinho L.T., Afonso J.A.B., Costa N.A., Mendonça C.L., Faria P.A.R. & Soares P.C. 2009. Avaliação da conduta terapêutica em casos de timpanismo espumoso em bovinos. *Cien. Anim. Bras.* 10(1):288-293.
- Delgado F.E.F., Lima W.S., Cunha A.P., Bello A.C.P.P., Wanderley, R.P.B., Leite P.V.B. & Leite R.C. 2009. Verminoses dos bovinos: percepção de pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18 (3): 29-33.
- Dirksen G. 1993. Sistema Digestivo, p.164-228. In: Rosenberger R.G. (Ed.), *Exame Clínico dos Bovinos*. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Fernandes L.G., Nogueira A.H.C., De Stefano E., Pituco E.M., Ribeiro C.P., Alves C.J., Oliveira T.S., Clementino I.J. & Azevedo S.S. 2016. Herd-level prevalence and risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 48:157–165.
- Figuera R.A. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia em cães. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 171p.
- Fraser C.M., Bergeron J.A, Mays A. & Aiello S.E. 1996. *Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário*. 7º ed. São Paulo: Roca.
- Fulton R.W., Briggs R.E., Ridpath J.F., Saliki J.T., Confer A.W., Payton M.E., Duff G.C., Step D.L. & Walker D.A. 2005. Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Can. J. Vet. Res.* 69(3): 161-169.
- Garry, F.B. 2006. Indigestão em ruminantes, p.722-747. In: Smith, B.P. *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3º ed. Barueri, SP: Editora Manole.

- Gheller L.F.M., Bueno A.V.I., Kastelijm D., Carneiro M.K. & Marcantonio M. Perfil da população de grandes animais assistidas pela clínica escola veterinária (Cevet – Unicentro) no biênio 2008-2009 em relação às principais espécies atendidas e os sistemas acometidos. 2010. Anais do XIX EAIC (Encontro anual de iniciação científica), Guarapuava –PR.
- Hansen L.B. 2000. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's point of view. *J. Dairy Sci.* 83(5):1145-1150.
- Lemos R.A.A, Rech R.R., Guimarães, E.B., Kadri A. & Dutra I.S. 2005. Febre catarral maligna em bovinos do Mato Grosso do Sul e de São Paulo. *Ciência Rural* 35(4) : 932-934.
- Lima W.S. 1998. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 74(2/4):203- 214.
- Lima A. G., Arêas V. S., Júnior L.V., Silva P.C.A.R. & Nunes L.C. 2008. Atendimento na rotina da clínica médica de animais de produção do hospital veterinário – UFES entre os anos de 2004 a 2008. IXI Encontro Anual de Iniciação Científica. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR.
- Lira M.A.A, Simões S.V.D., Riet- Correa F., Pessoa C.M.R., Dantas A.F.M. & Miranda Neto E.G. 2013. Doenças do sistema digestório de caprinos e ovinos no semiárido do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):193-198.
- Loss D.E., Vogt G., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Conceição E.O., Dalto A.G.C., Oliveira M.B. & Driemeier D. 2006. Ocorrência em surto de actinobacilose em bovinos mantidos em área de capim anoni (*Eragrostis plana*) no Rio Grande do Sul. Anais 2º Encontro Nacional de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário, Campo Grande, MS, p.41-42. (Resumo).
- Lucena R.B., Pierezan F., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Figuera R.A., Barros C.S.L. 2010. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):428-434.
- Martins A.M.C.R.P.F., Leme M.C.M., Portugal M.A.S.C., Baldassi L. & Margatho L.F.F. 2004. Presença de corpos estranhos no aparelho digestório dos bovinos. *Arq. Inst. Biol.* 71(1):83-87.
- Marques L.C., Cattelan J.W., Macoris D.G., Marques J.A., Portugal E.S., & Cadioli F.A. 2001. Estudo clínico, cirúrgico e anatomopatológico de intussuscepção em quatro bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 53(1): 52-57.
- Medeiros J.M.A., Garino Jr F., Almeida A.P., Lucena E.A. & Riet-Correa F. 2012. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Estado da Paraíba. *Pesq. Vet.* 32 (2):111-115.
- Méndez M.C. & Riet-Correa. Actinobacilose. 2007. In.: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JR. Doenças de ruminantes e equídeos. Pallotti, Santa Maria, p. 208-213.
- Mitchell K. 1991. Dietary abomasal impaction in a herd of dairyreplacement heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198 (8): 1408-1409.
- Moscardini A.R.C. & Borges J.R.J. 2007. Compactação de abomaso. In.: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JR. Doenças de ruminantes e equídeos. Pallotti, Santa Maria, p. 352-355.
- Mousavi G., Hassanpuor A., Tabrizi B.A. & Rezaie A. 2007. Eletrocardiographic changes in buffalo with traumatic reticuloperitonitis. *Italian Journal of Animal Science.* 6: 1029-1031.
- Murray M.J. & Smith B.P. 2006. Enfermidades do trato alimentar. In: Smith, B.P. (Ed.) *Medicina Interna de Grandes Animais.* 3. ed. Barueri: Manole, p. 593-789.
- Naser S.A., Ghobrial G., Romero C. & Valentine J.F. 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from blood of the patient with Crohn's disease. *Lancet Infect. Dis.* 364:1039-1044.

- Oliveira H.C., Silva L.C., Cunha Filho L.F.C., Santana E.H.W., Bogado A.L.G., Filho L.C.N. & Okano, W. 2013. Ocorrência de retículo pericardite traumática em bovinos de abate, na região de Araguari- MG. Rev. Bras. Hig. San. Anim. 7(2):. 192-202.
- O'Toole D., Li H., Roberts S., Rovnak J., DeMartini J.C., Cavender J., Williams B. & Crawford T.B. 1995. Chronic generalized obliterative arteriopathy in cattle: A sequel to sheep-associated malignant catarrhal fever. J. Vet. Diag. Invest. 7:108-121.
- O'Toole D., Li H., Miller D., Williams B. & Crawford T.B. 1997. Chronic and recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. Vet. Rec. 140:519-524.
- Otter A., Pow I. & Reid H.W. 2002. Outbreak of malignant catarrhal fever in Welsh black cattle in Carmarthenshire. Vet. Rec. 151:321-324.
- Pearson H. 1971. Intussusception in cattle. Vet Rec. 89:426-437.
- Pimentel Neto M. & Fonseca A.H. 1999. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bovinos de leite na microrregião homogênea do Vale do Paraíba Fluminense. Hora Vet. 19(112):41-46.
- Radostits OM., Gay CC., Blood DC. & Hinchcliff KW. 2002. Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1737p.
- Rech R.R., Schild A.L., Driemeier D., Garmatz S.L., Oliveira F.N., Riet-Correa F. & Barros C.S.L. 2005. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. Pesq. Vet. Bras. 25(2):97-105.
- Rehage J., Kaske M., Stockhofe-Zurwieden N. & Yalcin E. 1995. Evaluation of the pathogenesis of vagus indigestion in cow with traumatic reticuloperitonitis. J. Am. Med. Assoc., 207:1607-1611.
- Rebhum W.C. 2000. Doenças infecciosas do trato gastrointestinal. In: Doença do gado leiteiro. São Paulo:Roca.
- Rossiter C.A. & Burhans W.S. 1996. Farm-specific approach to paratuberculosis (John's disease) control. Vet. Clin. North Am., Food Anim Pract. 12:383-415.
- Silva R.J., Silva J.A.B.A., Costa N.A. & Mendonça C.L. 2014. Dilatação do ceco em bezerros: relato de casos. Rev. Bras. Ci. Vet. 21(2): 76-81.
- Silva Filho A.P., Afonso J.A.B., Souza J.C.A., Costa N.A. & Mendonça C.L. 2010. Análise clínica e patológica em 20 casos de intussuscepção em bovinos. Vet. e Zootec. 17 (3): 421-430.
- Silva Filho A.P., Afonso J.A.B., Riet-Correa F., Dantas A.F., Souza J.C.A., Dantas A.C., Costa N.A. & Mendonça C.L. 2011. Obstrução intestinal por linfossarcoma em bovinos: estudo retrospectivo. Vet. e Zootec. 18(2): 264-274.
- Silva Filho A.P., Afonso J.A.B., Souza J.C.A., Dantas A.C., Costa N.A. & Mendonça C.L. 2012. Achados clínicos de bovinos com úlcera de abomaso. Vet. e Zootec. 19(2): 196-206.
- Smith B.P. 2006. Febre catarral maligna. In: Smith, B.P. Medicina Interna de Grandes Animais. 3º ed. Barueri, SP: Editora Manole, p-714-716.
- Slana I., Liapi M., Moravkova M., Kralova A. & Pavlik I. 2009. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. Prev. Vet. Med. 89(3/4):223-226.
- Souza M.I., Afonso J.A.B., Costa N.A., Coutinho L.T. & Silva Filho A.P. 2011. Estudo Retrospectivo dos Casos de Obstrução Esofágica por Corpo Estranho em Ruminantes Atendidos na Clínica de Bovinos, Campus

- Garanhuns/UFRPE, entre os anos de 1980-2010. IX Congresso Brasileiro Buiatria. Goiânia - Goiás, Brasil. Vet. e Zootec. 18(4): 269
- Torres-Acosta J.F.J. & Hoste H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. Small Rum. Res. 77:159-173.
- Thompson K. 2007. Bones and joints, p.1-184. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.1. 5th ed.
- Thompson J.A., Leite R.M.H., Gonçalves V.S.P., Leite R.C., Bandeira D.A., Herrmann G.P., Moreira E.C., Prado P.E.F., Lobato Z.I.P., Brito C.P.T. & Lage A.P. 2006. Spatial and hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in State of Paraíba, Brazil. Prev. Vet. Med. 76(3-4): 290-301.
- Timms V.J., Gehringer M.M., Mitchell H.M., Daskalopoulos G. & Neilan B.A. 2011. Review. How accurately can we detect Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection? J. Microbiol. Methods 85:1-8.
- Vilar A.L.T., Santos C.S.A.B., Pimenta C.L.R.M., Freitas T.D., Brasila A.W.L., Clementino I.J., Alves C.J., Bezerra C.S., Riet-Correa F., Oliveira T.S. & Azevedo S.S. Herd-level prevalence and associated risk factors for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. Prev. Vet. Med. 121: 49-55.
- Weber M.N., Mósen A.C.S., Simões S.V.D., Almeida L.L., Pessoa C.R.M., Budaszewski R.F., Silva T.R., Ridpath J.F., Riet-Correa F., Driemeier D. & CANAL C.W. 2014. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with 'hobi'-like pestivirus in a field outbreak. Transbound. Emerg. Dis. doi:10.1111/tbed.12223.
- Wittek T., Sen I. & Constable P.D. 2007. Changes in abdominal dimensions during large gestation and early lactation in Holstein-Friesian heifers and cows and their relationship to left displaced abomasum. Vet. Rec. 161:155-161.
- Yamasaki E.M., Brito M.F., Mota R.A., McIntosh D. & Tokarnia C.H. 2013. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 33(2):127-140.

Os Quadros

Quadro 1. Grupos de enfermidades digestivas diagnosticadas em bovinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.

Grupos de enfermidades	Número de casos	Frequência (%)	Letalidade	
			N	%
Distúrbios motores da cavidade ruminorreticular	59	25,3	47	79,7
Distúrbios fermentativos da cavidade ruminorreticular	23	9,9	04	17,4
Doenças infecciosas	44	18,9	21	47,7
Doenças intestinais obstrutivas	42	18	20	47,6
Doenças parasitárias	22	9,4	06	27,3
Doenças intestinais inespecíficas	19	8,1	06	31,6
Afecções do abomaso	11	4,7	06	54,5
Afecções do esôfago	11	4,7	04	36,3
Doenças do peritônio	02	0,8	02	100

Quadro 2. Afecções digestivas diagnosticadas em bovinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Patos- Paraíba no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.

Enfermidades	Número de casos	Frequência (%)	Letalidade	
			N	%
Reticulopericardite traumática	31	13,3	31	100
Parasitoses gastrintestinais	22	9,4	06	27,3
Diarreia sem etiologia	19	8,1	06	31,6
Actinobacilose	16	6,9	00	00
Indigestão simples	14	6,0	00	00
Indigestão vagal	12	5,1	09	75
Intussuscepção	12	5,1	08	66,7
Eventração	12	5,1	03	25
Febre Catarral Maligna	10	4,3	09	90
Obstruções esofágicas	10	4,3	04	40
Reticuloperitonite traumática	09	3,9	07	77,8
Compactação abomasal	08	3,4	04	50
Doença das Mucosas/ Diarreia Viral Bovina	07	3,0	07	100
Actinomicose	07	3,0	01	14,3
Obstruções intestinais por fitobezoar	06	2,6	01	16,7
Compactação ruminal	04	1,7	00	0
Torção intestinal	04	1,7	04	100
Paratuberculose	04	1,7	04	100
Acidose ruminal	03	1,3	03	100
Reticulite traumática	03	1,3	00	00
Ruminite	03	1,3	01	33,3
Compactação do cólon	03	1,3	02	66,7
Prolapso retal	02	0,8	00	00
Dilatação cecal	02	0,8	01	50
Timpanismo espumoso	02	0,8	00	00
Úlcera de abomaso	02	0,8	02	100
Peritonite	02	0,8	02	100
Traumatismo esofágico	01	0,4	00	00
Deslocamento abomasal	01	0,4	00	00
Estenose do cólon	01	0,4	01	100
Indigestão do final da prenhez	01	0,4	00	00

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças digestivas são de grande importância para a clínica de bovinos. Conhecer sua frequência, bem como seus aspectos clinico-epidemiológicos proporciona diagnósticos mais precisos e a adoção de tratamentos e medidas de controle mais adequadas. A frequência de determinadas doenças se mostrou elevada devido ao manejo alimentar incorreto, que em algum momento é explicado pelos longos períodos de seca e escassez de alimentos que a região enfrenta. Além disso, o histórico de atendimento de animais com suspeita clínica de diarreia viral bovina, a identificação de um novo caso de infecção pelo vírus ‘Hobi’-like (BVDV-3) em bovinos do semiárido paraibano e a constatação de elevado percentual de bovinos soropositivos para BVDV sugere que esta enfermidade merece atenção, uma vez que pode causar prejuízos consideráveis para a bovinocultura da região, o que alerta para a implementação de medidas de prevenção nos rebanhos e, sobretudo, correção dos fatores de risco identificados. Especial atenção deve ser dada para a concentração de esforços no sentido de realização de estudos de prevalência que englobem o âmbito estadual e empregando amostragem probabilística com o objetivo de se determinar a real situação epidemiológica da doença na Paraíba.

ANEXOS

ANEXO I

Risk factors associated with Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) infection in the semiarid of the state of Paraíba, in the northeast region of Brazil

Fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no semiárido do estado da Paraíba, região nordeste do Brasil

Ana Luisa Alves Marques^{III}; Adriana Cunha de Oliveira Assis²; Sara Vilar Dantas Simões³; Mikael Leandro Duarte de Lima Tolentino⁴; Sérgio Santos de Azevedo^{3*}

Abstract

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) has become an important viral infectious agent in cows and is considered endemic in many regions. This study aimed to determine the epidemiological status of BVDV in bovine herds in the semiarid state of Paraíba, in northeastern Brazil, by determining the frequency of anti-BVDV antibodies and risk factors associated with the infection. We tested 359 cows from 20 rural locations. Three had a history of clinically suspected BVDV or mucosal disease (MD), whereas the other 17 locations were randomly selected. Detection of anti-BVDV antibodies was performed by indirect ELISA using a commercial kit (IDEXX BVDV p80 Ab Test). Risk factor analysis was performed in two steps, univariate and multivariate analysis. Seven samples were considered suspicious and excluded from the analysis of seropositive animals. Of 352 animals, 141 (40.1 %; CI 95 % = 34.9% - 45.2 %) were seropositive. Of the 20 locations analyzed, 19 (95%) had seropositive animals and the frequency of seropositivity per location varied between 4.5 % and 85.7 %. The risk factors identified were as follows: area \leq 120 hectares (OR = 3.06; CI 95 % = 1.43 – 6.53), high animal density (OR = 3.48; CI 95 % = 1.24–9.79), weaning age \leq 60 days (OR = 10.99; CI 95 % = 1.31–91.9), exchange of animals (OR = 4.95; CI 95 % = 2.08–11.8), calf mortality $>$ 5% (OR

^{III} Discente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Patos, PB. E-mail: analuisa_vet@hotmail.com

² Médica Veterinária, Prefeitura Municipal de Pombal, Pombal, PB. E-mail: drica.cvet@yahoo.com.br

³ Profs., Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB. E-mail: saravdsimoes@gmail.com; sergio@vps.fmvz.usp.br

⁴ Discente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Patos, PB. E-mail: mikaeltolentino@gmail.com

= 2.33; CI 95 % = 1.07–5.11), and use of natural breeding and artificial insemination (OR = 3.06; CI 95 % = 1.22 – 7.67). It was suggested that to avoid the transmission of BVDV infection in bovine herds in the Sertão of Paraíba, it is important to prevent identified associated risk factors and to perform further studies, identifying persistently infected animals.

Keywords: BVDV, control, viral diseases, epidemiology

Resumo

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tem emergido como um dos mais importantes agentes virais infecciosos em bovinos, sendo considerado endêmico em várias regiões. Objetivou-se com este estudo determinar a situação epidemiológica da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em rebanhos bovinos do semiárido paraibano, nordeste do Brasil, pela determinação da frequência de anticorpos anti-BVDV e de fatores de risco associados à infecção. Foram utilizadas 359 vacas de 20 propriedades rurais, sendo três propriedades com histórico de suspeita clínica de diarreia viral bovina (BVD) ou doença das mucosas (DM) e 17 sorteadas aleatoriamente. A detecção de anticorpos anti-BVDV foi realizada com *kit* comercial ELISA indireto (IDEXX BVDV p80 Ab *Test*) e a análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Sete amostras foram consideradas suspeitas e foram excluídas do cálculo da frequência de animais soropositivos. Dos 352 animais, 141 (40,1%; IC 95% = 34,9% - 45,2%) foram soropositivos. Das 20 propriedades analisadas, em 19 (95%) havia animais soropositivos e a frequência de soropositividade por propriedade variou de 4,5% a 85,7%. Os fatores de risco identificados foram: área \leq 120 ha (OR = 3,06; IC 95% = 1,43 – 6,53), alta densidade de animais (OR = 3,48; IC 95% = 1,24 – 9,79), idade ao desmame até 60 dias (OR = 10,99; IC 95% = 1,31 – 91,9), permuta de animais (OR = 4,95; IC 95% = 2,08 – 11,8), mortalidade de bezerros $>$ 5% (OR = 2,33; IC 95% = 1,07 – 5,11) e utilização de monta natural + inseminação artificial (OR = 3,06; IC 95% = 1,22 – 7,67). Sugere-se que para evitar a difusão da infecção pelo BVDV em rebanhos bovinos do sertão paraibano é importante a correção dos fatores de risco identificados, bem como é necessário conduzir estudos para a identificação de animais persistentemente infectados.

Palavras-chave: BVD, controle, doenças virais, epidemiologia

Introduction

The dissemination characteristics of viral infections are of constant concern for veterinarians and producers. Pestiviruses are potentially the viruses that most frequently affect bovines (SANDVIK,

1999). In this context, the bovine viral diarrhea virus (BVDV) has become an important viral infectious agent of bovines, and is considered endemic in many regions (BACHOFEN et al., 2013). It is believed that the economic impact of these infections cannot be estimated, as the virus causes sudden losses due to subfertility and immunosuppression in infected animals (RODNING et al., 2012).

Bovine viral diarrhea (BVD) is caused by an RNA-virus of the *Flaviviridae* family, genus *Pestivirus*. Clinical manifestations of this virus can include respiratory disease, gastroenteric disease, hemorrhagic syndrome with thrombocytopenia, abortions, temporary infertility, congenital defects, immunosuppression, and mucosal diseases (MD) (GROOMS; KEILEN, 2002). However, reproductive problems are considered the most important, as BVDV exhibits tissue tropism to germ cells. In addition, viral activity in the ovarian tissue can lead to failures or delays in ovulation during estrus, which can result in low fertilization rates. When infected at the beginning of pregnancy, females can lose the embryo or fetus (abortion and/or mummification). When infected between 40 and 125 days of pregnancy, females can give birth to persistently infected (PI) animals, which are responsible for the maintenance of the virus in herds (BROWNLIE, 2002; GROOMS, 2004). The virus also shows tropism for lymphoid cells, causing immunosuppression resulting from the depletion of T and B lymphocytes. Additionally, BVDV interferes with the activity of macrophages, which promotes the occurrence of secondary infections (BROWNLIE, 2002; RADOSTITS et al., 2002).

The most commonly used techniques to detect antibodies against BVDV are virus neutralization (VNT) and immunoenzymatic assays such as ELISA. VNT is adequate for the quantification of antibodies, and is carried out by titration. However, since it is a complex and expensive test, ELISA has been used in Europe as an alternative, as it is faster and cheaper. In addition, can be applied to individual samples or serum and milk pools, especially in unvaccinated herds (HOUE et al., 2006; PRESI; HEIM, 2010; ROSSMANITH et al., 2010; STAHL; ALENIUS, 2012; BOOTH et al., 2013).

The first epidemiological study of BVDV in Paraíba was performed in 2006, a serum survey of 2,343 animals from 18 locations (THOMPSON et al., 2006). In that study, a seroprevalence of 22.2 % was found to be distributed over 88.9 % of the sampled locations. However, no risk factors were assessed. The identification of risk factors associated with BVDV infection became relevant as identified indicators were used to guide the planning of preventive and control measures used to directly decrease the dissemination of infection and minimize economic loss.

In Paraíba, over the last few years, animals with clinical symptoms suggestive of MD were treated in the Veterinarian Hospital (VH) of the Federal University of Campina Grande (UFCG), located in the city of Patos. BVDV was recently isolated in an outbreak in the city of Pombal (WEBER et al., 2014). Thus, considering that the virus was confirmed in herds in Paraíba, it is necessary to understand the epidemiology of BVDV, since the state does not have a history of vaccination against BVDV.

The goal of this study was to assess the epidemiological status of BVDV infection in bovine herds in the semiarid area of Paraíba by determining the frequency of anti-BVDV antibodies and identifying risk factors associated with the infection.

Materials and Methods

A survey was performed on files from the period between 2000 and 2013, at the Medical Clinic for Large Animals of VH/UFCG, to identify cases of suspected BVD or MD. Three herds were identified as having suspected history of the disease, two in the city of Patos and one in the city of Piancó. In the period between July 2013 and March 2014, 17 additional randomly selected locations were visited, located in the same cities or neighboring areas (Figure 1) of aforementioned locations. During those visits, blood samples were collected for the detection of antibodies, and epidemiological questionnaires were performed to collect information about variables used to analyze risk factors of disease (Table 1). The study included 20 properties, without a history of BVDV vaccination, distributed in nine counties in the mesoregion of the Sertão of Paraíba, including Patos (three properties), Santa Terezinha (one), Itaporanga (one), Santa Luzia (three), Igaracy (one), Aguiar (three), São José de Espinharas (one), Piancó (five), and Pombal (two). This research project was previously approved by the Ethics Committee on Animal Research (CEP) of UFCG, under the protocol number 25-2012.

To calculate the minimum number of animals to be sampled, an expected prevalence of 50 % was considered (number adopted to maximize the sample), with a confidence level of 95 % and an absolute error of 6 % (NOORDHUIZEN et al., 1997), using the following formula for simple random samples:

$$n = \frac{z^2 P(1-P)}{d^2}$$

Where:

n = number of sampled animals;

Z = value of the normal distribution for a 95% confidence level;

P = expected prevalence;

d = absolute error.

The minimum number of animals to be sampled was 267; however, 359 animals were selected. All bovines in these locations were selected for blood sample collection. Blood samples were then centrifuged to obtain serum, and stored at -70 °C.

To detect anti-BVDV antibodies, we used the IDEXX BVDV p80 Ab Test, which is a commercial indirect ELISA kit (Pourquier Institute, Montpellier SAS, France). This kit uses a non-structural p80 protein as an antigen, and has a sensitivity and specificity of 97.6 % and 97.27 %, respectively, according to the information of the manufacturer's validation data report. The test was performed in compliance with the manufacturer's instructions, using polystyrene 96-well plates and reading them in a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm (A_{450}). The results were calculated as the percentage of inhibition, according to the following formula: $A/N = 100 \times (A_{450\text{sample}}/ CNx)$, where A/N is the sample ratio, $A_{450\text{sample}}$ is the sample to be assessed and CNx is the mean of the negative control. The results were interpreted as follows: samples with A/N ratio greater than or equal to 50 % were considered negative, whereas samples with an A/N ratio less than or equal to 40 % were considered positive; samples with an A/N ratio between 40 and 50 % were considered suspicious.

The analysis of risk factors was performed in two stages, univariate and multivariate analysis. For univariate analysis, each independent variable was crossed with the dependent variable (serum status of the animal). The variables with $P \leq 0.2$ in the chi-square test were selected for multivariate analysis, using multiple logistic regression (HOSMER; LEMESHOW, 2000). The adjustment of the final model was verified using the determination coefficient (R^2). The collinearity between the predictor variables was verified by correlation analysis. For data with strong collinearity (correlation coefficient > 0.9), one of the two was excluded from multiple analysis, according to their biological plausibility (DOHOO et al., 1996). The level of significance adopted in the multiple analysis was 5 %, and all analyses were performed using the program SPSS 20.0 for Windows.

Results and Discussion

Seven samples were considered suspicious and not included in analysis. Of 352 animals assessed, 141 (40.1 %; CI 95 % = 34.9 % - 45.2 %) were seropositive. Of the 20 properties evaluated, 19 (95 %) had seropositive animals, and the frequency of seropositive animals per location varied between 4.5% and 85.7%. Other studies performed in northeastern Brazil, determined BVDV frequencies of 67.3 % in the city of São Luís, state of Maranhão (SOUSA et al., 2013), 65.66 % in the regions of Bacabal and Pedreiras, state of Maranhão (CHAVES et al., 2009), and 72.6 % in nine cities in the microregion of the Meridional Agreste, in the state of Pernambuco (CASTRO et al., 1993). The semiarid region of Paraíba showed relatively low frequency, even though it was above the 22.2 % rate reported by Thompson et al. (2006), also in Paraíba. These results raise concerns, as an increase in the percentage of seropositive animals was found in regions with a history of clinical suspicion of MD, suggesting that the virus is disseminating between herds in the mesoregion of Sertão. These data indicate that frequencies of seropositive animals can be even higher in other regions of Paraíba, since the prevalence of infection can vary according to the region and factors such as bovine population density and handling.

The frequencies of seropositive animals per city are shown in Figure 1. The survey performed on the clinical files of VH verified that animals with a presumptive diagnosis of MD were from the cities of Piancó and Patos. These regions, together with the municipalities of Aguiar, Pombal, and Igaracy presented the highest frequency of seropositive animals in this study. It is important to highlight that in the city of Pombal the virus had been previously isolated (WEBER et al., 2014). In addition, the sale or exchange of animals is common in this region, which could contribute to the dissemination of the viral agent.

The presence of BVDV in herds induces a humoral response, resulting in the production of antibodies in animals in contact with the virus. These animals become seropositive for life, even after the elimination of the virus (HOUE, 1992). In contrast, vaccines do not induce a significant and long-lasting serological response in most animals. Low antibody titers with a short duration are observed when using inactive vaccines, compared to that observed with modified-live virus vaccines (VOGEL et al., 2002). However, BVDV vaccination is not performed in this region, which indicates that antibodies were associated with an infection in these herds. The fact that only inactive vaccines are licensed in Brazil confirms that serum responses were due to infection, as only live vaccines induce the production of antibodies against the NS3 protein. This means that the ELISA test will detect the response to natural infection.

According to Brownlie et al. (1989), BVDV, when present in herds, induces a high rate of seropositivity, varying between 60 and 90 %. Houe and Meyling (1991) stated that the presence or absence of PI animals in herds could be determined by serological analysis, since a comparative study demonstrated that in 10 herds in contact with PI animals, 87 % of animals were seropositive compared to 43 % seropositivity detected in nine herds not in contact with PI animals. Thus, the high prevalence of seropositive animals provides indirect evidence of the presence of PI animals. This ratio has been used as a way to obtain an early diagnosis in herds, testing a small sample, to detect antibodies against BVDV in areas where vaccination is not performed. Herein, the frequency of positive diagnosis (in 20 properties in Paraíba) varied between 4.5 % and 85.7 %, and in six properties, this rate was above 60 %. With this information, further studies are required to identify PI or temporarily infected (TI) animals.

PI animals are considered the main disseminators of virus, since they are often asymptomatic, serologically negative, and continually clear the virus via secretions and excretions (FULTON et al., 2005). The clinical manifestation of MD can occur in animals up to 24 months of age, which enhances the risks of dissemination throughout the herd (RIDPATH; FLORES, 2007). The percentage of seropositive animals in properties located in cities without MD suspicion (Santa Terezinha, Itaporanga, Santa Luzia and São José de Espinharas) was lower than in that in cities where the disease was reported (Piancó, Patos and Pombal).

Table 1 shows results of the univariate analysis for risk factors. The variables selected ($P \leq 0.20$) for multiple analysis were area of the property, animal density, weaning age, animal purchase,

animal exchange, calf mortality, occurrence of abortions, age of abortions, decrease in milk production, handling of reproduction, calving paddock, and restriction on the entry of people. In the final logistic regression model (Table 2), the identified risk factors were area ≤ 120 hectares (OR = 3.06), high animal density (OR = 3.48), weaning age of ≤ 60 days (OR = 10.99), animal exchange (OR = 4.95), calf mortality $> 5\%$ (OR = 2.33), and the application of natural breeding and artificial insemination (OR = 3.06). The final model showed a good adjustment ($R^2 = 0.347$).

Animals raised in properties with areas less than or equal to 120 hectares and with high density showed a higher risk of seropositivity compared to animals raised on properties with areas larger than 120 hectares and with a lower population density. This combination of small area and high density suggests more agglomeration and direct contact between the animals, which favors the dissemination of BVDV. Direct contact is the most efficient way to transmit the virus, especially in the presence of PI animals in the herd (NISKANEN et al., 1996).

Newborn ruminants show negligible gammaglobulin levels, which only increases when ingesting quality colostrum, in the right timeframe. Between 15 and 30 days of age, the levels of gammaglobulin decrease significantly, probably due to the consumption or degradation of passively transferred immunoglobulins (TIZARD, 2002). When maternal antibodies decrease, the animal quickly acquires immunological competence by initiating the endogenous synthesis of immunoglobulins (ECKERSALL, 1997). This generally occurs starting at 60 days of age, with maximum levels obtained at 150 days of age, when there is a significant increase in gammaglobulin levels, probably due to the animal's response to exposure to antigen stimuli (TIZARD, 2002; CORTESE, 2009). At approximately 60 days of age, calves start to develop their own immunity; therefore, if weaned before this period, they become more vulnerable to infectious agents present in the environment. In addition, such weaning practices can cause stress to the animal. This can explain the higher risk of seropositivity in animals weaned on or before 60 days of age.

The purchase and exchange of animals are classic risk factors for the occurrence and dissemination of infectious and parasitic diseases. In this study region, it is common to exchange animals without performing BVDV diagnostic tests. This could be an important factor for the dissemination of the agent within herds. It is important to consider that the only property that did not have any seropositive animals did not have a history of purchase or exchange of animals.

Even though calf mortality above 5% was identified as a risk factor, this parameter should not be identified as a risk factor, but rather a consequence of the infection, which could also be associated with improper newborn handling. However, the risk of PI calves that are part of herds with a mortality rate above 5% is real. Although they can show late clinical signs, PI animals usually have delayed growth, congenital malformations, and higher susceptibility to secondary infections (RIDPATH; FLORES, 2007). According to Brownlie (2002), agents such as type 1 bovine herpesvirus, coronavirus, *Pasteurella haemolytica*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, and *Salmonella* spp. are often associated with clinical BVD cases.

In the semiarid region of Paraíba, some properties such as the use of natural breeding associated with artificial insemination, was also identified as a risk factor. Quincozes et al. (2007) has previously reported that the use of artificial insemination and natural breeding contributed to an increased risk of seropositivity in the state of Rio Grande do Sul. The use of artificial insemination has become increasingly common due to the growth of technical assistance programs that encourage this practice at low costs. However, several quality control measures are necessary to ensure that the assisted reproduction techniques do not facilitate viral transmission (GIVENS; WALDROP, 2004). When performed in compliance with international rules, with sanitary control of the herd, and with proper semen processing, insemination is a safe assisted reproduction procedure. However, in some cases, the origin and quality of the semen is unknown, making females and the herd vulnerable. Weber et al. (2014), when reporting a BVD outbreak in the state of Paraíba, suggested that one viral point of entry was the purchase of a bull and cows from Southern Brazil, or the unassisted use of semen.

Additional risk factors identified in this study could contribute to decreased prevalence of viral infections in the region. Therefore, we suggest the following measures: (a) weaning only after 60 days, a time when calves are better equipped to produce efficient responses; (b) improving the animals' living area to decrease population density; (c) the purchase or exchange of animals should be done only after conducting a BVDV test; (d) more careful semen purchase for artificial insemination purposes, which should only come from bulls submitted to sanitary control.

Conclusion

To avoid the transmission of BVDV in herds of the Sertão of Paraíba, it is important to mitigate risk factors identified in this study. Other epidemiological studies need to be performed at a state level, to confirm the prevalence of infection and the presence of permanently infected animals.

Acknowledgements

We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support, and to Prof. Dra. Márcia Almeida de Melo for technical and laboratory support.

References

BACHOFEN, C.; VOGT, H-R.; STALDER, H.; MATHYS, T.; ZANONI, R.; HILBE, M.; SCHWEIZER, M.; PETERHANS E. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Veterinary Research*, London, v. 44, n. 32, p. 1-10, 2013.

BOOTH, R. E.; CRANWELL, M. P.; BROWNLIE, J. Monitoring the bulk milk antibody response to BVDV: the effects of vaccination and herd infection status. *Veterinary Record*, London, v. 172, n. 17, p. 449-456, 2013.

BROWNLIE, J.; CLARK, M. C.; HOWARD, C. J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Research in Veterinary Science*, London, v.46, n.3, p.307-311, 1989.

BROWNLIE, J. Bovine diarrhoea virus: pathogenesis and control. Proceedings of the XXII World Buiatrics Congress, Hannover. 2002.

CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H.; ABREU S. R. O.; MUNIZ, A. M. M.; ALBUQUERQUE A. P. S. Anticorpos neutralizantes contra *Pestivirus* em soros bovinos no estado do Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 28, n.11, p. 1327-1331, 1993.

CHAVES, P. N.; BEZERRA, D. V.; BORGES, F. C.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados nas regiões de Bacabal e Pedreiras, estado do Maranhão. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, Suplemento 1 (Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria), p. 502-507, 2009.

CORTESE, V. S. Neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, New York, v. 25, n. 1, p. 221-227, 2009.

DOHOO, I. R.; DUCROC, C.; FOURICHON, C.; DONALD, A.; HURNIK, D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Preventive Veterinary Medicine*, London, v. 29, n. 3, p. 221-239, 1996.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5^a ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 116-155.

FULTON, R. W.; BRIGGS, R. E.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; CONFER, A. W.; PAYTON, M. E.; DUFF, G. C.; STEP, D. L.; WALKER, D. A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Ottawa, v.69, n.3, p.161-169, 2005.

GIVENS, M. D.; WALDROP, J. G. Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production systems. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, New York, v. 20, n.1, p. 21-38, 2004.

GROOMS, D. L.; KEILEN, E. D. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, New York, v. 9, n. 4, p.898-900, 2002.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, New York, v. 20, v. 1, p. 5-19, 2004.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375p.

HOUE, H.; MEYLING, A. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine*, London, v. 11, n. 1, p. 9–16, 1991.

HOUE, H. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Research in Veterinary Science*, London, v. 53, n.3, p. 320–323, 1992.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Stanford, v. 18, n.5, p. 427–436, 2006.

NISKANEN, R.; LINDBERG, A.; LARSSON, B.; ALENIOUS, A. Primarily BVDV-infected calves as transmitters of the infection. Proceedings of the XIX World Buiatrics Congress, Edinburgh, Scotland, p. 593-595, 1996.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFF, C. M.; GRAAT, E. A. M. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen: Wageningen Press. 1997. 445p.

PRESI, P.; HEIM, D. BVD eradication in Switzerland - a new approach. *Veterinary Microbiology*, Amsterdã, v. 142, n.1-2, p. 137-142, 2010.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas por vírus e Chlamydia-I. In: RADOSTITS, O. M.; GAY, C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 974-993.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1ª ed. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 582-589.

RODNING, S. P.; GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D.; ZHANG, Y.; RIDDELL, K. P.; GALIK, P. K.; HATHCOCK, T. L.; GARD, J. A.; PREVATT, J. W.; OWSLEY, W. F. Reproductive and economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus into a naive group of heifers. *Theriogenology*, London, v. 78, n. 7, p. 1508-1516, 2012.

ROSSMANITH W., Deinhofer M., Janacek R., Trampler R. & Wilhelm E. Voluntary and compulsory eradication of bovine viral diarrhoea virus in Lower Austria. *Veterinary Microbiology*, Amsterdã, v. 142, n. 1-2, p. 143-149, 2010.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, Amsterdã, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.

SOUSA, V. E.; BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 21-25, 2013.

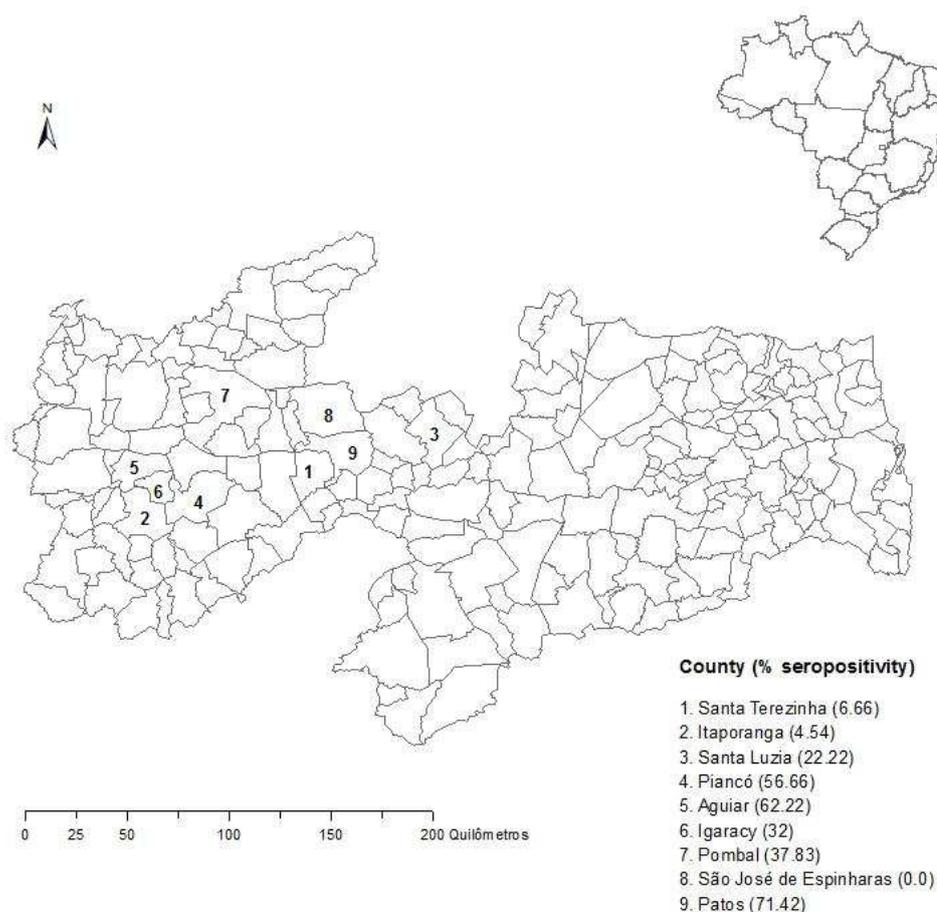
STAHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe —an update. *Japanese Journal of Veterinary Research*, Hokkaido, v. 60, Supl, S:31-39, 2012.

WEBER, M. N.; MÓSENA A. C. S.; SIMÕES, S. V. D.; ALMEIDA, L. L.; PESSOA, C. R. M.; BUDASZEWSKI, R. F.; SILVA, T. R.; RIDPATH, J. F.; RIET-CORREA, F.; DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with ‘hobi’-like pestivirus in a field outbreak. *Transboundary and Emerging Diseases*, Oxford, v. 63, n. 1, p. 92-100, 2014.

THOMPSON, J. A.; LEITE, R. M. H.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; PRADO, P. E. F.; LOBATO, Z. I. P.; BRITO, C. P. T.; LAGE, A. P. Spatial and hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in State of Paraíba, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, London, v. 76, n. 3-4, p. 290-301, 2006.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; MAYER, S. V.; QUADROS, V. L.; OLDONI, I. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 83-89, 2002.

Figure 1. Map of the state of Paraíba showing counties investigated and their respective seropositivity frequencies.



Source: Elaborated by the authors

Table 1. Univariate analysis of variables most commonly associated ($P \leq 0.20$) with BVDV seropositivity in bovines of the semiarid region of Paraíba.

Variable	Category	Total no. of bovines	No. of positive bovines (%)	P
Type of production	Milk	177	78 (44.1)	0.219
	Beef	12	3 (25.0)	
	Mixed	163	60 (36.8)	
Farming method	Extensive	113	47 (41.6)	0.650
	Intensive	39	13 (33.3)	
	Semi-intensive	200	81 (40.5)	
Property area	\leq ha ^a	172	89 (51.7)	<0.001*
	> 120 ha	148	36 (24.3)	
Pasture area	\leq 10 ha	183	77 (42.1)	0.245
	> 10 ha	137	48 (35.0)	
Animal density	Medium	114	21 (18.4)	<0.001*
	Low	167	80 (47.9)	
	High	71	40 (56.3)	
Weaning age	Between 60-90 days	15	1 (6.7)	0.004*
	\leq days	192	71 (37.0)	
	> 90 days	145	69 (47.6)	
Milking method	No milking	12	3 (25.0)	0.525
	Manual	321	131 (40.8)	
	Mechanic	19	7 (36.8)	

Animal purchase	No	27	7 (25.9)	0.175*
	Yes	325	134 (41.2)	
Animal exchange	No	252	87 (34.5)	0.001*
	Yes	100	54 (54.0)	
Weak calves	No	221	93 (42.1)	0.371
	Yes	131	48 (36.6)	
Anomalies in calves	No	321	125 (38.9)	0.237
	Yes	31	16 (51.6)	
Calf mortality	< 5 %	314	115 (36.6)	<0.001*
	> 5 %	38	26 (68.4)	
Occurrence of abortion	No	194	92 (47.4)	0.003*
	Yes	158	49 (31.0)	
Age of abortion	No abortion	194	92 (47.4)	< 0.001*
	> 3 months	71	32 (45.1)	
	< 3 months	87	17 (19.5)	
Return to heat	No	88	33 (37.5)	0.660
	Yes	264	108 (40.9)	
Decrease in milk production	No	126	37 (29.4)	0.003*
	Yes	226	104 (46.0)	
Reproduction handling	Natural breeding	269	99 (36.8)	0.034*
	Breeding + AI ^b	83	42 (50.6)	
Presence of other animal species	No	83	28 (33.7)	0.224
	Yes	269	113 (42.0)	
Origin of water	Well	61	21 (34.4)	0.266
	River	62	22 (35.5)	
	Weir	40	21 (52.5)	
	All of the above	189	77 (40.7)	
Quarantine	No	272	105 (38.6)	0.370
	Yes	80	36 (45.0)	
Calving paddock	No	306	113 (36.9)	0.003*
	Yes	46	28 (60.9)	
Restrictions on the entry of people	No	133	36 (27.1)	<0.001*
	Yes	219	105 (47.9)	

Veterinary assistance	No	133	57 (42.9)	0.556
	Yes	194	76 (39.2)	
	Occasionally	25	8 (32.0)	

* Variables selected for multiple analysis by logistic regression ($P \leq 0.20$); ^a Hectares; ^b Artificial insemination

Source: Elaborated by the authors

Table 2. Risk factors, estimated using multiple logistic regression, associated with BVDV seropositivity in bovines of the semiarid region of Paraíba.

Variable	Odds ratio	CI 95 %	P
Area \leq 120 ha	3.06	1.43 – 6.53	0.004
High density	3.48	1.24 – 9.79	0.018
Weaning age \leq 60 days	10.99	1.31 – 91.9	0.027
Animal exchange	4.95	2.08 – 11.8	< 0.001
Calf mortality > 5%	2.33	1.07 – 5.11	0.034
Use of natural breeding + artificial insemination	3.06	1.22 – 7.67	0.017

$R^2 = 0.347$

Source: Elaborated by the authors

ANEXO II

DIRETRIZES PARA AUTORES SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente **traduzidos para o inglês**.

Os artigos enviados para a revista até dezembro/2013 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

[American Journal Experts](#)

[Editage](#)

[Elsevier](#)

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

O autor principal deverá anexar no sistema o **documento comprobatório** dessa correção na página de submissão em “**Docs. Sup.**”

OBSERVAÇÕES:

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).

NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação; b) Não tenha sido realizado o **cadastro completo** de todos os autores nos metadados de submissão; **Exemplo:** Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da Biografia/Titulação/função
- c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;
- d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar “**Docs. Sup.**” no ato da submissão;
- e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)
- f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

RESTRICÃO POR ÁREA:

PARA A ÁREA DE AGRONOMIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) Os experimentos com cultura in vitro sejam limitados ao melhoramento dos protocolos já padronizados ou que não forneçam novas informações na área;
- b) Os experimentos de campo não incluam dados de pelo menos dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;
- c) Os experimentos se refiram apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos, abióticos ou estresses fisiológicos;
- d) Envolvam apenas bioensaios (screening) de eficácia de métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças de plantas, exceto se contiverem contribuição importante sobre mecanismos de ação numa perspectiva de fronteira do conhecimento;
- e) O objetivo seja limitado a registrar a ocorrência de espécies de pragas ou patógenos ou associações entre hospedeiros em novas localidades dentro de regiões geográficas onde eles já sejam conhecidos. Registros de espécies ou associações conhecidas só serão considerados em novas zonas ecológicas. Os registros de distribuição devem se basear em ecossistemas, e não em fronteiras políticas.

PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA

- a) A publicação de relatos de casos é restrita e somente serão selecionados para tramitação àqueles de grande relevância ou ineditismo, com real contribuição ao avanço do conhecimento para a área relacionada.

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo título.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: **Fonte:** IBGE (2014), ou **Source:** IBGE (2014).

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os

mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. **Material e Métodos...** *Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. Título do trabalho, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3. Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4. Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

- a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha⁻¹. Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.

- d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹ ou gL⁻¹.
- e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem espaçamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes.** A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologias completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a sequência - introdução, metodologia, resultados e discussão (podem ser incluídas tabelas e figuras), conclusão e referências bibliográficas.

Relato de caso

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, resultados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agrônomo, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os autores somente poderão apresentar artigos de interesse da revista mediante convite de membro(s) do comitê editorial da Revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "Ad hoc" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.

2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.

5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

6. *Numero de autores*: Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte como co-autores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas que tiveram uma pequena participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos, bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a **formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO**.
3. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão.**

Utilize o botão "**incluir autor**"

1. **No passo seguinte preencher os metadados em inglês.**

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

1. A **identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação Cega por Pares](#).
2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11;

1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão

de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.

2. Efetuar o pagamento da **Taxa de Submissão de artigos** e anexar o comprovante como documento suplementar “**Docs. Sup.**”

Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ANEXO III

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

PESQUISA VETERINÁRIA BARSILEIRA

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). **Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.