



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JULIANA ALVES DIAS

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO  
HERPESVIRUS BOVINO 1 (BoHV-1) EM REBANHOS  
BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ**

---

Londrina  
2008

JULIANA ALVES DIAS

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO  
HERPESVIRUS BOVINO 1 (BoHV-1) EM REBANHOS  
BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de pòs-Graduação,  
e, Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciência Animal (área de  
concentração em Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Ernst Eckehardt Muller  
Co-orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina  
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

D541p Dias, Juliana Alves.  
Prevalência e fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos no Estado do Paraná / Juliana Alves Dias. – Londrina, 2008.  
114 f. : il.

Orientador: Ernst Eckehardt Muller.  
Co-orientador: Amauri Alcindo Alfieri.  
Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Vírus do herpes em animais – Teses. 2. Rinotraqueíte bovina – Estudos transversais – Teses. 3. Epidemiologia veterinária – Teses. I. Muller, Ernst Eckehardt. II. Alfieri, Amauri Alcindo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619:636.2

JULIANA ALVES DIAS

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO  
HERPESVIRUS BOVINO 1 (BoHV-1) EM REBANHOS BOVINOS DO  
ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de pÒs-Graduação,  
e, Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciência Animal (área de  
concentração em Sanidade Animal).

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto  
Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Vitor Salvador Picão Gonçalves  
Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Alice Fernandes Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Julio César de Freitas  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Ernst Eckehardt Muller  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 12 de junho de 2008.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Ernst Eckehardt Muller.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

## DEDICATÓRIA

Às pessoas que mais me importam: meu pai Ernesto e minha mãe Ana Maria, meus irmãos Leandro e Flaviana, meus referenciais de amor, união, honestidade e dignidade.

À minha avó Manoela e meus avós Sebastião, Conceição e Maximino (*in memoriam*), pelo exemplo de dedicação, amizade e solidariedade.

Aos familiares e amigos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus...

Ao professor e orientador Prof. Dr. Ernst Eckehardt Muller pelo exemplo de profissionalismo e caráter; pelos anos de convívio, compartilhando experiências, conhecimentos e amizade. Muito obrigada.

Ao professor e co-orientador Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, pela seriedade e profissionalismo. Por me acolher em seu laboratório e pelos ensinamentos indispensáveis à realização deste trabalho. Agradeço sinceramente as palavras de incentivo nas fases críticas do projeto e de caráter pessoal.

À professora Dr<sup>a</sup> Alice Fernandes Alfieri, pelo carinho e amizade.

Ao professor Dr. Julio César de Freitas, pelos ensinamentos transmitidos e pelas palavras de estímulo e amizade.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Prof. Dr. Julio César de Freitas, Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri e Prof. Dr<sup>a</sup> Alice Fernandes Alfieri pelas valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto pelo conhecimento técnico e auxílio prontamente disponíveis ao longo da execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Salvador Picão Gonçalves, pelo auxílio na elaboração e execução do PECETB.

À Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB-PR), em especial ao setor de Epidemiologia pelo auxílio no delineamento experimental, e aos veterinários e técnicos da Divisão de Defesa Sanitária responsáveis pelos trabalhos de campo.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Doutorado.

Ao pessoal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG).

À pesquisadora e amiga Kerlei Cristina Médici pela disponibilidade, amizade e auxílio técnico fundamentais para a realização desta tese.

Ao técnico José Aldevino pelo auxílio em todos os projetos desenvolvidos e principalmente pela amizade.

À técnica Dalíria do Prado pela ajuda durante a realização do projeto, pelo excelente convívio e demonstrações de carinho.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial à Dona Cidinha, Helio, Eliana, Ademir, Maria José, Cris e Neuza pelo carinho nesses anos de convivência.

Aos secretários Valdecir, Reinaldo e Helenice pela paciência, dedicação e trâmites burocráticos.

Ao Bruno, pelo companheirismo e dedicação.

À querida amiga Japa, pela sincera amizade, dedicação e carinho sempre constantes. Ao amigo Kleber pelo companheirismo desde o primeiro dia de faculdade. À Lory pela disponibilidade e dedicada amizade. À Betinha e Flora por todo carinho, preocupação e sincera amizade. Ao Kledis, pela companhia agradável e ótima energia.

Aos amigos queridos, Chimele, Marlise, Alexandre, Danilo, Frango, Rita, Kátia, Michelle, Walfrido, Graziela, Cláudia Boselli, Lívia, Paty, Carol, Íris, Rosa, Fabiana, Romerson, Maurinho, Eleine, Mykel, Matão, Pimenta, Juliana Miyazaki, Rômulo, Fernando,

Caco, Nikita, Ju Tiemi e Bruno Fabris, pela amizade sincera em todos esses anos. Muito obrigada.

Às amigas e colegas do Laboratório de Microbiologia e Leptospirose, Francielle, Lucimara, Lucienne, Bruna, Daniela, Carioca, Elaine, Valéria.

A todos os estagiários e bolsistas de iniciação científica dos laboratórios de Virologia Animal e Microbiologia e Doenças Infecciosas.

Aos colegas e amigos da SEAB, pela agradável recepção e amizade que está se formando.

Aos queridos amigos Losani, Jucelino e Cainã, por me acolherem em sua casa e pelas sinceras demonstrações de carinho e amizade.

À Família Mazzer Oliveira Ramos, em especial a Lucinei, pela dedicação e preocupação constantes.

À minha família, avós, tios, primos, por me apoiarem em todos os projetos e pelas palavras de otimismo e sabedoria.

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

DIAS, J.A. **Prevalência e fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos do estado do Paraná.** 2008. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), agente etiológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), é considerado um dos principais patógenos de bovinos sendo responsável por grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária. Estudos sorológicos e etiológicos revelaram a presença e alta frequência da enfermidade em rebanhos de grande parte do país, entretanto a situação epidemiológica da doença no Estado do Paraná não está totalmente elucidada. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência e os fatores de risco associados ao BoHV-1 no estado do Paraná, destacando a região oeste (NR Cascavel e Toledo), que envolve o circuito produtor em maior desenvolvimento do estado. O delineamento estatístico, amostras de soro e informações referentes às propriedades foram as empregadas para o estudo da brucelose bovina no Estado do Paraná dentro do contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Para o estado, foram avaliadas 14.083 fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses provenientes de 2018 rebanhos não vacinados contra o BoHV-1. Na região oeste, foram avaliadas 1930 fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses provenientes de 295 rebanhos não vacinados. Para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BoHV-1 foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Em cada propriedade foi aplicado um questionário epidemiológico, a fim de obter informações sobre tipologia e práticas de manejo empregadas. A prevalência de propriedades e animais do estado foi de 71,30% [69,29-73,32%] e 59,02% [56,19-61,85%], respectivamente e as variáveis associadas à infecção pelo BoHV-1 na análise de regressão logística multivariada foram: i) exploração de corte (OR=1,58; IC: 1,12-2,23); ii) compra de reprodutores (OR=1,90; IC: 1,52-2,37); iii) monta natural (OR=1,48; IC: 1,02-2,14); iv) aluguel de pasto (OR=2,24; IC: 1,51-3,33); v) presença de piquete de parição (OR=1,56; IC: 1,20-2,03); vi) histórico de aborto nos últimos 12 meses (OR=1,45; IC: 1,08-1,95). Na região oeste, a prevalência de rebanhos foi de 64,41% (I.C.95% = 58,65-69,87%) e as variáveis consideradas fatores de risco para a infecção pelo BoHV-1 na análise de regressão logística multivariada foram: i) número (> 23) fêmeas com idade > 24 meses (OR=2,22; IC: 1,094,51); ii) compra de reprodutores (OR=2,68; IC: 1,48-4,82); iii) uso de pastagens comuns (OR=5,93; IC: 1,31-26,82); iv) histórico de abortamento nos últimos 12 meses (OR=2,37; IC: 1,09-5,16); v) presença de animais silvestres (OR=8,86; IC: 1,11-70,73). Estes resultados indicam que a infecção pelo BoHV-1 está amplamente distribuída no estado do Paraná e que fatores relacionados às características das propriedades e ao manejo estão associados à infecção.

**Palavras-chave:** Prevalência. Epidemiologia. Fator de risco. Herpesvírus bovino 1. ELISA indireto.

DIAS, J.A. **Prevalence and risk factors for bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) in cattle herds in Parana State.** 2008. 103p. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), is the etiological agent of infectious rhinotracheitis (IBR) and an important pathogen of cattle that is responsible for economics losses to the cattle industry. Serological and etiological studies demonstrated the presence and the high frequency of the disease in herds in most of the country, however the epidemiologic situation in Parana State is not fully described. The aim of this study was to estimate the prevalence and to identify the risk factors for BoHV-1 infection in breeding cattle herds in the Parana State and Western region (regional administration of Cascavel and Toledo), which include the fast developing livestock regions. The study design, the blood samples and the information on selected farms, were the same applied to the survey of bovine brucellosis in Parana, within the context of National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis. For the whole of Parana State, 14,083 females aged > 24 months were tested, from 2,018 nonvaccinated herds. For the West region, 1930 females aged > 24 months were tested, from 295 nonvaccinated herds. Blood samples were tested for antibodies against BoHV-1 using an indirect ELISA. An epidemiological questionnaire was applied to all sampled farms. Herd and animal seroprevalence in Parana State were 71.30% [69.29-73.32%] and 59.02% [56.19-61.85%], respectively. Herds of beef cattle (OR=1.58; IC: 1.12-2.23), natural breeding (OR=1.48; IC: 1.02-2.14), purchase of animals (OR=1.90; IC: 1.52-2.37), the rent of pasture (OR=2.24; IC: 1.51-3.33), existence of calving pens (OR=1.56; IC: 1.20-2.03) and history of abortion in the last 12 months (OR=1.45; IC: 1.08-1.95) were identified as risk factors for BoHV-1 infection in the multivariate logistic regression. In West region, the prevalence of positive herds was 64.41% [58.65-69.87%] and variables identified as risk factors for BoHV-1 infection were the number (> 23) of females aged 24 months (OR=2.22; IC: 1.09-4.51), purchased cattle (OR=2.68; IC: 1.48-4.82), use of common grass (OR=5.93; IC: 1.31-26.82), history of abortion in the last 12 months (OR=2.37; IC: 1.09-5.16) and presence of wildlife animals (OR=8.86; IC: 1.11-70.73). These results indicate that BoHV-1 infection is widespread in Parana State and that factors related to the herd characteristic and management are associated with the infection.

**Keywords:** Prevalence. Epidemiology. Risk factors. Bovine herpesvirus 1. Indirect ELISA.

## LISTA DE QUADROS

### Revisão de Literatura

<b>Quadro 1</b> – Resumo dos estudos sorológicos regionais para o diagnóstico do BoHV-1 realizados no Brasil .....	19
--	----

### Fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região oeste do estado do Paraná.

<b>Quadro 1</b> – Prevalência aparente de focos de BoHV-1 estratificada por tipo de exploração na região oeste do estado do Paraná .....	46
<b>Quadro 2</b> – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para o BoHV-1 em rebanhos bovinos da região oeste do estado do Paraná.....	46
<b>Quadro 3</b> – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados ao BoHV-1 em rebanhos com atividade reprodutiva da região oeste do estado do Paraná.....	48

### Prevalência, distribuição geográfica e fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos do estado do Paraná, Brasil.

<b>Quadro 1</b> – Dados censitários da população bovina do estado do Paraná em 2001, segundo os circuitos produtores (Paraná 2001).....	68
<b>Quadro 2</b> – Prevalência de focos do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) nos circuitos produtores e estado do Paraná.....	75
<b>Quadro 3</b> – Prevalência de focos do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) estratificada por tipo de exploração (corte, leite e misto) nos circuitos produtores e estado do Paraná.....	75
<b>Quadro 4</b> – Prevalência de animais sororreagentes ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) nos circuitos produtores e estado do Paraná.....	76

<b>Quadro 5</b> – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos do estado do Paraná.....	77
<b>Quadro 6</b> – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos com atividade reprodutiva do estado do Paraná.....	78

## LISTA DE FIGURAS

### **Fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região oeste do estado do Paraná.**

- Figura 1** – Mapa do estado do Paraná demonstrando a região oeste, alvo do presente estudo ..... 39
- Figura 2** – Diagrama de blocos mostrando a dispersão do tamanho dos rebanhos de acordo com o sistema de exploração na região oeste do estado do Paraná ..... 45

### **Prevalência, distribuição geográfica e fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos do estado do Paraná, Brasil.**

- Figura 1** – Mapa do estado do Paraná demonstrando a divisão em circuitos produtores. Detalhe destacando a localização do estado do Paraná no Brasil..... 67
- Figura 2** – Diagrama de blocos mostrando a dispersão do tamanho dos rebanhos bovinos de acordo com o sistema de exploração zootécnica nos circuitos produtores e estado do Paraná ..... 74

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
1.1 ETIOLOGIA.....	15
1.2 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES .....	16
1.3 TRANSMISSÃO .....	17
1.4 EPIDEMIOLOGIA .....	18
1.5 CONTROLE E PROFILAXIA.....	21
1.5.1 Vacinas .....	22
1.5.2 Situação dos Programas de Controle e/ou Erradicação de BoHV-11.6 .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>3 ARTIGO I – FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO HERPESVÍRUS BOVINO 1 EM REBANHOS BOVINOS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ</b> .....	34
ABSTRACT.....	34
RESUMO .....	35
INTRODUÇÃO .....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	38
População estudada .....	38
Delineamento amostral .....	38
Colheita das amostras de sangue e dados epidemiológicos .....	40
Teste sorológico.....	41
Análise de dados.....	42
RESULTADOS.....	44
Caracterização da amostra .....	44
Prevalência de propriedades positivas .....	45
Análise dos fatores de risco .....	45

DISCUSSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	53
<b>4 ARTIGO II – PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO HERPESVÍRUS BOVINO 1 (BOHV-1) EM REBANHOS BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL .....</b>	<b>61</b>
RESUMO.....	62
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
População estudada.....	66
Delineamento amostral.....	68
Colheita da amostras de sangue e dados epidemiológicos.....	69
Teste sorológico para o BOHV-1.....	70
Análise de dados.....	71
Cálculo das prevalências.....	71
Estudo dos fatores de risco.....	72
RESULTADOS.....	73
Caracterização da população amostrada.....	73
DISCUSSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	86
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>100</b>

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 ETIOLOGIA

O herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), agente etiológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), é um dos principais patógenos de bovinos, responsável por consideráveis perdas econômicas em rebanhos de corte e de leite (SMITH et al., 1995; Van OIRSCHOT, 1998).

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e é subdividido nos subtipos BoHV-1.1, isolados de problemas respiratórios, reprodutivos e conjuntivites, e BoHV-1.2, mais frequentemente isolados em infecções genitais (vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa-IPV/BPV) (METZLER et al., 1985; MAGYAR et al. 1993).

A partícula viral apresenta entre 70 a 110 nm de diâmetro e é constituída por capsídeo icosaédrico, envelope glicoproteico e genoma DNA fita dupla linear (FENNER, 1987). O envelope viral é constituído por glicoproteínas que desempenham funções vitais no processo de infecção viral, mediando os processos de reconhecimento e adsorção às células alvo, penetração do virion, fusão e disseminação do vírus célula a célula em cultivos celulares (ROIZMAN, 1996).

Dez glicoproteínas foram descritas e são denominadas gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM, que se diferenciam em suas propriedades antigênicas, moleculares e biológicas. As glicoproteínas gB, gD e, provavelmente, a gH, gK e gL são essenciais para a replicação dos alfa herpesvirus em cultivo celular. As glicoproteínas gC, gG, gI e gE são dispensáveis para o ciclo replicativo em cultivo, mas desempenham funções importantes nas interações com o hospedeiro e, provavelmente, são necessárias à sobrevivência do vírus na natureza. A gC é a glicoproteína mais abundante do envelope e é altamente imunogênica, forma protusões na superfície do *virion* e parece estar envolvida na ligação do vírus com os receptores celulares.

A replicação viral ocorre no núcleo celular. A maturação envolve a encapsidação do DNA no interior do nucleocapsídeo, seguida pela aquisição do envelope durante o processo de brotamento. A produção da progênie viral infecciosa é acompanhada pela lise da célula infectada (ROIZMAN et al. 1992; FENNER et al., 1993).

## 1.2 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

Os vírus pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae* se caracterizam por apresentar rápido ciclo de replicação celular. Em consequência, lesões necróticas são produzidas, particularmente na pele e mucosas do trato respiratório e genital (Van ENGELBURG et al., 1995). A gravidade da doença causada pelo BoHV-1 é influenciada por fatores como a virulência da estirpe (JIANG et al., 1998), a resistência do hospedeiro, especialmente a idade, e o potencial para infecções bacterianas intercorrentes (MUYLKENS et al., 2007).

As infecções sistêmicas são mais frequentes em animais jovens, desprovidos de imunidade passiva, e comprometem principalmente o trato respiratório e digestivo. As lesões observadas no trato digestivo em neonatos incluem glossites, esofagites e rumenite necrosante aguda, podendo levar à morte em 4-5 dias (MUYLKENS et al., 2007).

A forma respiratória caracteriza-se por aumento da temperatura corporal, hiperemia das mucosas, rinite, dispnéia, corrimento nasal seroso, lesões erosivas na mucosa nasal e, ocasionalmente, pneumonia. A taxa de letalidade é baixa, no entanto podem ocorrer complicações em decorrência de infecções bacterianas secundárias ou de outras infecções virais superpostas (KARHS 1977, WYLER et al. 1989). A conjuntivite causada pelo BoHV-1, geralmente associada à forma respiratória, caracteriza-se por secreção ocular profusa inicialmente serosa e com evolução à mucopurulenta, além de opacidade da córnea. Ocasionalmente, pústulas e placas de material necrótico são observadas na conjuntiva. A evolução é de 5 a 10 dias (RIET-CORREA et al., 1996).

A viremia (célula associada) em fêmeas prenhes pode acarretar a transferência transplacentária do vírus desencadeando uma série de distúrbios reprodutivos caracterizados por mortalidade embrionária (precoce e tardia), natimortalidade e infertilidade (FENNER, 1987)

A forma genital em fêmeas manifesta-se clinicamente com o aparecimento de pequenas vesículas de 1 a 2 mm de diâmetro que evoluem para pústulas e erosões localizadas na vulva e vagina. O epitélio vulvar apresenta-se edemaciado, hiperêmico e com secreção que pode se tornar mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária. Em touros, lesões similares são encontradas no prepúcio e pênis (GIBBS; RWWEYEMANN 1977; WYLER et al. 1989). Embora a infecção causada pelo BoHV-1.2 seja restrita a órgãos

genitais, foram descritas infecções mais graves evoluindo para orquites em touros e endometrites em vacas (GIBBS et al., 1977).

### 1.3 TRANSMISSÃO

A transmissão do BoHV-1 pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados ou por contato direto com secreções nasais de animais infectados. Ambas as formas de transmissão são consideradas importantes na disseminação do vírus em rebanhos criados sob condições confinadas (Van DONKERSGOED; BABIUK 1991). A transmissão indireta ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados e pelo uso, nas coletas de sêmen, de vaginas artificiais contaminadas (ENGELS; ACKERMANN 1996).

Outra forma de transmissão é a venérea, pela monta natural e/ou inseminação artificial (IA) onde, nesta última, o sêmen desempenha papel fundamental na cadeia epidemiológica (PHILPOTT 1993). O sêmen geralmente é contaminado durante a ejaculação, por contato com o vírus presente na mucosa prepucial. Vários estudos demonstram que muitos patógenos presentes no sêmen podem manter-se viáveis frente ao processo de congelamento, tornando a prática da IA uma possível veiculadora de doenças no rebanho (EAGLESOME; GARCIA 1992). A IA de vacas com sêmen contaminado pelo BHV-1 reduz a taxa de concepção e pode causar infertilidade, endometrite, aborto e o desenvolvimento anormal do feto (ELAZHARY et al., 1980; WYLER et al., 1989).

Membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* caracterizam-se pela habilidade em estabelecer latência em gânglios de nervos sensoriais, principalmente os gânglios trigêmeos. A ausência de replicação viral resulta na ausência de sinais clínicos, caracterizando uma infecção subclínica de difícil detecção. Os herpesvírus podem ser reativados quando os animais são submetidos a fatores estressantes (ROCK, 1994; COLODEL et al., 2002), resultando na retomada da replicação lítica nos neurônios hospedeiros e produção da progênie viral com reexcreção de partículas infecciosas (CERQUEIRA et al., 2000; VIEIRA et al., 2003).

Novas progênies virais são eliminadas em altos títulos e são responsáveis pela alta disseminação da doença no rebanho. A taxa básica de reprodução (RO), que descreve a dinâmica da doença na população, e é definida como a média de casos secundários gerados a partir de um caso primário em uma população totalmente susceptível de densidade

definida, foi estimada experimentalmente em pelo menos sete em rebanhos leiteiro, demonstrando a rápida difusão do vírus na população estudado (HAGE et al. 1996).

#### 1.4 EPIDEMIOLOGIA

A IBR foi descrita pela primeira vez por Miller et al. (1955) nos EUA e o primeiro isolamento foi realizado neste mesmo país em 1956, a partir de animais apresentando doença respiratória (MADIN et al., 1956). A doença apresenta ampla distribuição (KAHRS, 1977; PORTERFIELD, 1989; WEIBLEN et al., 1992) e alta freqüência em rebanhos bovinos de todo o mundo (MICKELSEN; EVERMANN, 1994).

Na Europa, alguns países caracterizados por pequenos rebanhos e baixa prevalência da infecção obtiveram a condição de livres com a implantação de programas de erradicação (ACKERMANN et al., 2006). Países como a Bélgica, Holanda e Itália caracterizados pela alta freqüência de BoHV-1 estabeleceram medidas de controle baseadas na utilização de vacinas (ACKERMANN et al., 2006).

Na América do Sul, estudos envolvendo a epidemiologia do BoHV-1, têm demonstrado que a freqüência de animais sororreagentes varia de 13 a 68% (ROEHE et al. 1998). No Brasil, a doença foi primeiramente detectada em 1963 em um levantamento sorológico no Estado da Bahia e, posteriormente, estudos sorológicos e etiológicos revelaram a presença e alta freqüência da enfermidade em rebanhos de grande parte do país. A situação epidemiológica é variável nos estados, com freqüências de animais sororreagentes ao BoHV-1 variando entre 18,8% e 96,01% (Quadro 1). A interpretação desses resultados deve considerar a população avaliada, características dos testes de diagnóstico e a presença de delineamento experimental no estudo. Fatores como a posição geográfica e características de manejo também devem ser considerados nas diferenças regionais de incidência e prevalência do BoHV-1 (MUYLKENS et al. 2007). O resumo das freqüências de BoHV-1 encontradas em estudos e diagnósticos de rotina realizados no Brasil está apresentado no Quadro 1.

Local	Ano	Procedência	Técnica	Propriedades pos/n (%) <sup>*</sup> Animais pos/n (%) <sup>**</sup>	Autor
São Paulo	1981	Bovinos	SN	162 / 384 (42,18)**	Muller et al. (1981)
Rio Grande do Sul	1986	Bovinos provenientes de 19 municípios	SN	430 / 526 (81,75)**	Ravazzolo et al. (1989)
Vários estados	1989	Bovinos de oito zonas fisiográficas	HAP	MG 210 / 317 (66,24)** GO 48 / 56 (85,7)** RJ 22 / 27 (81,5)**	Amuniação et al. (1989)
Vários estados	1988 - 1992	Bovinos – Amostra de demanda	SN	SP 1296 / 2967 (43,6) ** PR 96 / 489 (19,7)** MG 113 / 210 (53,8)** RGS 66 / 94 (70,2)** MS 38 / 71 (53,5)** RJ 31 / 49 (63,2)** BA 17 / 20 (85)**	Pituco et al. (1993)
Rio Grande do Sul	1995	Amostras de 99 municípios distribuídos em 9 bacias leiteiras	SN	371 / 685 (54,5)* 1496 / 7956 (18,8)**	Lovato et al. (1995)
Rio Grande do Sul	1995	Rebanhos da Região Sul com histórico de problemas reprodutivos	SN	80 / 112 (71,3)* 747 / 2341 (31,9)**	Vidor et al. (1995)
Pernambuco	1995	Bovinos provenientes de 18 rebanhos e 9 municípios da região agreste meridional	SN	196 / 282 (69,5)**	Silva et al. (1995)
Paraná	1997	Bovinos provenientes de propriedades do município de Palotina	SN	16 / 24 (66,7)* 65 / 240 (27,1)**	Barros Filho et al. (1997)
Sergipe	1997	Bovinos de matadouro	SN	98 / 102 (96,01)**	Melo et al. (1997)
Vários estados	1988 - 1997	Bovinos com histórico de problemas reprodutivos	SN	11.162 / 30.151 (37)**	Del fava & Pituco (1998)
Vários estados	1998	Touros de centrais de inseminação artificial – SP-MG-RGS	SN	95 / 131 (72,5)**	Pituco (1998)
Vários Estados	1999	Bovinos provenientes de 56 propriedades de corte e leite	Elisa (Herdcheck)	PR (67,42)** MS (86,08)** MG (67,43)** SP (68,65)** RJ (76,54)** RGS (45,91)**	Richtzenhain et al. (1999)
Paraná	1995	Rebanhos de corte e leite com histórico de problemas reprodutivos provenientes de 30 municípios	SN	Corte 18 / 18 (100) * 131 / 258 (50,8) ** Leite 57 / 63 (90,5)* 409 / 977 (41,9)**	Médici et al. (2000)
Vários estados	1995 - 2001	Bovinos com histórico de problemas reprodutivos	SN	PR 6519 / 12439 (52,4) ** GO 3563 / 4821 (73,9) ** MS 2906 / 4188 (69,4) ** MT 3551 / 2669 (75,2) **	Takiuchi et al. (2001)

**Quadro 1** – Resumo dos estudos sorológicos regionais para o diagnóstico do BoHV-1 realizados no Brasil.

O conhecimento das propriedades do BoHV-1, manifestações clínicas, formas de transmissão e hospedeiros susceptíveis, é essencial para identificação de variáveis que possam estar envolvidas com a introdução e manutenção do vírus no rebanho. Com base em levantamentos sorológicos, estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os fatores de risco associados à soropositividade ao BoHV-1.

Embora bovinos de todas as idades e raças sejam susceptíveis ao BoHV-1, a infecção é mais freqüente em animais acima de 6 meses de acordo com resultados descritos por Silva et al. (1995), McDermott et al. (1997), Hage et al. (1998), Melo et al. (2002), Solis-Calderon et al. (2003) e Barbosa et al. (2005). Van Donkersgoed et al. (1991) e McDermott et al. (1997) reportaram que associação entre idade e infecção pelo BoHV-1 provavelmente ocorra devido ao maior tempo de exposição ao vírus em animais mais velhos.

Características do rebanho, como tamanho e densidade populacional, são descritos como fatores de risco para o BoHV-1 (McDERMOTT et al., 1997; MILLER et al., 2001; SOLIS-CALDERON et al., 2003). A associação entre o tamanho do rebanho e a soropositividade para o BoHV-1 pode ser atribuída a outras variáveis, fortemente relacionadas com o tamanho de rebanho, como a freqüência de compra de animais, participação em eventos agropecuários, visitas profissionais e presença de trabalhadores regulares e temporários nas propriedades (Van SCHAİK et al., 1998; Van SHAIK et al., 2002).

Vários autores citam a compra de animais em período de incubação ou nas fases aguda ou latente da infecção pelo vírus como principal fator de introdução do BoHV-1 no rebanho (MSOLLA et al., 1981; PASTORET et al., 1982). Van Schaik et al. (1998) estudando os fatores de risco para introdução do BoHV-1 em rebanhos leiteiros da Holanda, demonstraram que propriedades que compravam animais teriam 3,5 vezes maior probabilidade de serem positivas que propriedades fechadas, considerando uma média de compra de 4,5 animais por ano. Boelaert et al. (2005) identificaram que a interação dos fatores tamanho do rebanho e compra de animais foi associada à soropositividade ao BoHV-1 em rebanhos da Bélgica.

A distancia entre propriedades foi considerada fator de risco no estudo realizado por Van Shaik et al (1998), que relataram que o risco relacionado a esse fator pode ser atribuído a variáveis como: correntes de ar, visitas de vizinhos e crianças, contato com outros animais (cães, gatos, ratos etc.) e entre bovinos de propriedades vizinhas. Embora a transmissão interespecie não seja considerada importante na disseminação do vírus, outras espécies animais podem atuar como possíveis reservatórios. Estudos experimentais demonstram que o BoHV-1 é capaz de infectar ovinos e caprinos e estabelecer infecção

latente em gânglios trigêmeos, e a reativação viral pode ocorrer quando os animais são submetidos a tratamentos com corticóides (WAFULA et al., 1995; ENGELS et al., 1992; SIX et al., 2001). Cervídeos inoculados experimentalmente com o BoHV-1 apresentaram quadros respiratórios e eliminação intermitente do vírus em animais imunodeprimidos (THORSEN et al., 1977).

## 1.5 CONTROLE E PROFILAXIA

Os objetivos do controle da infecção pelo BoHV-1 envolvem a redução do impacto clínico e a prevenção da transmissão viral (MUYLKENS et al., 2007).

Membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* caracterizam-se pela habilidade em estabelecer latência e a reativação da replicação lítica apresenta grande importância epidemiológica, sendo responsável pela manutenção do BoHV-1 na população bovina. A infecção de novas gerações de bovinos a partir de portadores latentes ocorre quando estes são submetidos a determinadas condições como parto, transporte ou introdução de novilhas dentro de um grupo de vacas adultas.

Considerando a situação epidemiológica do vírus, as medidas de controle podem se basear no controle da manifestação clínica ou eliminação da infecção no rebanho. Medidas sanitárias associadas à imunoprofilaxia são elementos importantes para o controle da infecção, em regiões de alta prevalência. Estratégias de controle são definidas com o objetivo de restringir a introdução da doença no rebanho e envolvem a realização de testes sorológicos e quarentena dos animais introduzidos. O contato direto e indireto com bovinos originados de rebanhos que possuem histórico sanitário desconhecido deve ser evitado (BOELAERT et al., 2005).

O controle das partidas de sêmen de touros reprodutores em centrais de inseminação apresenta grande importância, devido ao potencial de distribuição de partidas em propriedades que utilizam a Inseminação Artificial e também pelas condições de armazenamento do sêmen que favorece a conservação do vírus (ROCHA et al. 1999). Deve ser considerado que a eliminação do BoHV-1 pelo sêmen pode ser intermitente e que o vírus pode ser isolado de bovinos soronegativos (HUCK, 1971; XIA et al., 1995; GEE et al., 1996).

### 1.5.1 Vacinas

Diferentes tipos de vacinas contra o BoHV-1 estão licenciadas para uso veterinário: vivas modificadas ou atenuadas, inativadas, de subunidade, DNA e vacinas por vetores virais.

Vacinas vivas contêm estirpes atenuadas do vírus que são capazes de se replicar no hospedeiro (Van OIRSCHOT et al., 1996), induzindo resposta imunológica tanto humoral quanto celular. São descritos dois métodos de atenuação: o tradicional (por passagens em cultivos celulares) e por indução química (mutantes termosensíveis), cujos efeitos diferem principalmente na segurança em relação à fase reprodutiva do animal a ser imunizado (ZYGRAID et al., 1974). As vacinas mutantes termosensíveis apresentam capacidade de replicação em temperaturas inferiores à temperatura corporal. Por isso a partícula vacinal apresenta somente um a dois ciclos de replicação no local da aplicação.

As estirpes virais utilizadas em vacinas inativadas são cultivadas em células em altos títulos e posteriormente são inativadas por processos químicos (Van OIRSCHOT et al., 1996). Na dependência do tipo de adjuvante imunológico utilizado as vacinas inativadas podem determinar bons títulos de anticorpos. Alguns fatores são críticos para a qualidade da vacina como: a seleção do adjuvante, a substância química utilizada na inativação e o título do antígeno (DUQUE et al., 1989). Vacinas inativadas não induzem ou induzem pouco a imunidade celular considerando protocolos de administração de duas doses na primovacinação, e os anticorpos produzidos interferem no resultado das provas sorológicas. Silva et al. (2007), avaliando a imunogenicidade de vacinas disponíveis no mercado brasileiro, conforme o protocolo recomendado, verificaram que apenas duas de seis vacinas utilizadas apresentaram títulos de anticorpos compatíveis com proteção ( $> 1: 16$ ). Na República Tcheca, os efeitos imunogênicos e protetores de uma vacina inativada produzida nacionalmente foram testados e apresentaram bons índices de proteção quando utilizada em programa de controle de IBR (POSPISIL et al., 1996).

O uso de vacinas deletadas (gene gE deletado) associado à realização de testes sorológicos que detectam anticorpos gE específicos, permitem diferenciar animais vacinados de infectados. Vários estudos demonstram a eficácia de vacinas deletadas inativadas ou atenuadas, com redução da incidência de animais gE positivos e da prevalência da infecção no rebanho (MARS et al., 2001). Entretanto, essa ferramenta é dependente da

performance do teste diagnóstico em detectar anticorpos gE específicos. O teste de ELISA disponível para esse fim apresenta apenas sensibilidade de 70% (KRAMPS et al., 2004).

Vários estudos estão sendo realizados para se obter uma nova geração de vacinas contra o BoHV-1 em que incluem vacinas de subunidade e DNA. Vacinas de subunidade estão sendo testadas e as pesquisas envolvem principalmente a utilização de glicoproteínas B, C e D expressas em diferentes sistemas de transferência em culturas de células (Van DRUNEN LITTEL; Van den HURK et al. 1994). Vacinas de subunidade baseadas em gD têm demonstrado melhores resultados na redução dos sinais clínicos e excreção viral quando são desenvolvidas com adjuvantes efetivos (MUYLKENS et al. 2007).

### 1.5.2 Situação dos Programas de Controle e/ou Erradicação de BoHV-1

Os primeiros focos de IBR observados na Europa ocorreram em 1970. Desde então, países europeus reagiram com programas de controle considerando a estrutura econômica e interesses de cada país. A partir da década de 90, esforços foram concentrados para erradicação do BoHV-1 em países europeus. Países como a Dinamarca, Áustria, Finlândia, Noruega e Suécia, caracterizados por baixa prevalência, iniciaram programas de erradicação nas décadas de 80 e 90 e, atualmente, apresentam a condição de livres de IBR.

Considerando experiências dos programas de erradicação realizados na Europa, as estratégias mais eficientes foram o descarte de animais soropositivos e ausência de vacinação. As campanhas de erradicação do BoHV-1 foram mais eficazes em países que apresentavam baixa prevalência do vírus e diretrizes governamentais para o controle. (ACKERMANN et al., 2006)

Países europeus que apresentavam altas frequências de BoHV-1, demonstram a viabilidade da utilização de vacinas com marcadores genéticos, estratégia que permite a diferenciação de animais infectados e vacinados. Na Alemanha, em que a prevalência é variável, estratégias distintas são adotadas considerando a frequência da doença. Em áreas de baixa prevalência é realizado o descarte de animais soropositivos e ausência de vacinação, e em áreas de alta prevalência são utilizadas vacinas marcadas e eliminação dos animais gE positivos (ACKERMANN et al., 2006).

Países como Estados Unidos e Canadá, caracterizados pela alta prevalência de IBR, estabeleceram programas de controle baseados na utilização de vacinas vivas e

inativadas. Esta estratégia atua na diminuição das perdas econômicas devido à doença clínica, entretanto contribui para a alta prevalência do vírus (Van DRUNEN LITTEL; Van den HURK et al., 1997).

No Brasil, assim como em outros países da América do Sul a prevalência do BoHV-1 é alta e medidas de controle são baseadas na vacinação de animais susceptíveis. Atualmente, vacinas com marcadores genéticos ainda não foram registradas pelo Ministério da Agricultura e as medidas de controle da infecção adotadas são de iniciativa voluntária, baseadas na utilização ou não de vacinas, tendo por objetivo o controle e/ou a erradicação da IBR. Não há diretrizes propostas pelo serviço oficial de sanidade animal do país referentes ao controle do BoHV-1.

## REFERÊNCIAS

- Ackermann M., Peterhans E. & Wyler R. 1982. DNA of bovine herpesvirus 1 in trigeminal ganglia of latently infected calves. **Am. J. Vet. Res.** 4:36-40.
- Ackermann M. & Engels M. 2006. Pro and contra IBR-eradication. **Vet. Microbiol.** 113:293-302.
- Alfieri A.A. 1999. **Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)**: Epidemiologia, imunologia e imunoprofilaxia. Atualização Técnica, 46.
- Anunciação A.V.M., Leite R.C., Moreira E.C. & Reis R. 1989. Presença de anticorpos para o herpesvirus bovino 1 (BHV-1) em bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemoaglutinação passiva. **Arq. Bras. Méd. Vet e Zootec.** 41(5):433-441.
- Barbosa A.C.V.C., Brito W.M.E.D. & Alfaia B.T. 2005. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Cienc. Rural.** 35(6):1368-1373.
- Barros Filho I.R., Krüger E.R., Souza J.F. & Rickli Júnior W. 1997. Incidência de bovinos soropositivos para o vírus da rinotraqueíte bovina no município de Palotina-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA 25 Gramado. **Anais...** Gramado, RS: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária. INF 062, p. 171.
- Boelaert F., Speybroeck N., Kruif A., Aerts M., Burzykowski T., Molenberghs G. & Berkvens D.L. 2005. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Prev. Med. Vet.** 69:285-295.
- Cerqueira R.B., Carminati R., Silva J.M., Soares G.C., Meyer R., Sardi S. 2000. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Braz J. Vet. Res. Anim. Sci.** 37(6):1-8.
- Colodel E.M., Nakazato L., Weiblen R., Mello R.M., Silva R.R.P., Souza M.A., Filho J.A.O., Caron L. 2002. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Cienc. Rural,** 32(2):293-298.
- Duque R.L., Marshall B.A., Israel G.J. & Letchworth G.J. 1989. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. **Vaccine.** 7(6):513-520.

Eaglesome M.D. & Garcia M.M. 1992. Microbial agents associated with bovine genital tract infectious and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter* and *Trichomonas foetus*. **Vet. Bull.** 62(8):743-775.

Engels M., Ackermann M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesviruses infections. **Vet. Microbiol.** 53:3-15.

Elazhary M.A.S.Y., Lamothe P., Silim A. & Roy R.S. 1980. Bovine herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. **Can. Vet. J.** 21:336-339.

Faria B.O., Freneau G.E., Brito W.M.E.D., Campos Jr. A.C.P. & Vieira S. 2003. Estudo de anticorpos contra o herpesvirus bovino tipo 1 em municípios do entorno de Goiânia, GO. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 27(3):543-545.

Fenner, F. 1987. **Veterinary Virology**. 1<sup>st</sup> ed. Academic Press, Londres. 445p.

Fenner, F. 1993. **Veterinary Virology**. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London. 666p.

Gee A.L.W., Watger L.H.A. & Hage J.J. 1996. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Microbiol.** 53(1):163-168.

Gibbs E.P.J., Rweyemann M.M. 1977. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Vet. Bull.** 47(5):

Hage J.J., Schukken Y.H., Barkema H.W., Benedictus G., Rijsewijk F.A.M. & Wentink G.H. 1996. Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. **Vet Microbiol.** 53:169-180.

Huck R.A., Millar P.G., Evans D.H., Stables J.W & Ross A. 1971. Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. **Vet. Rec.** 88:292-297.

Jiang Y., Hossain A., Winkler M.T., Holt T., Doster A. & Jones C. 1998. A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent Kinase 2 during productive infection. **J Virol.** 72:8133-8142.

Kahrs R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 171(10):1055-1064.

Kramps J.A., Banks M., Beer M., Kerkhofs P., Perrin M., Wellenberg G.J. & van Oirschot J.T. 2004. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. **Vet. Microbiol.** 102:169-181.

Lovato L.T., Weiblen R., Tobias F.L. & Moraes M.P. 1995. Herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc. Rural**, 25(3):425-430.

Magyar G., Tanyi J., Hornyák A. & Bartha A. 1993. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR/IPV and encephalitis. **Acta Vet. Hung.** 4(1/2):159-170.

Mars M.H., de Jong M., Franken P. & van Oirschot J.T. 2001. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. **Vaccine.** 19:1924-1930.

McDermott J.J., Kadohira M., O'Callaghan C.H. & Shoukri M.M. 1997. A comparison of different models for assessing variations in the sero-prevalence of infectious bovine rhinotracheitis by farm, area and district in Kenya. **Prev. Vet. Med.** 32:219-234.

Médici K.C., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2000. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvirus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Cienc. Rural.** 30(2):347-350.

Melo C.B., Oliveira A.M., Figueiredo H.C.P., Leite R.C. & Lobato Z.I.P. 1997. Prevalência de anticorpos contra herpesvirus bovino-1, vírus da Diarréia Bovina à vírus e vírus da Leucose Enzoótica Bovina em bovinos do Estado de Sergipe, Brasil. **Vet. Bras. Reprod. Anim.** 21(2):160-161.

Melo C.B., Lobato Z.I.P., Camargos G.N., Souza N.R.S, Martins & Leite R.C. 2002. Distribuição de anticorpos para herpesvirus bovino 1 em rebanhos bovinos. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** 54(6):575-580.

Metzler A.E., Matile H., Gassmann V., Engels M. & Wyler R. 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. **Arch. Virol.** 85:57-59.

Mickelsen W.D. & Evermann J.F. 1994. In utero infections responsible for abortions, stillbirth and birth of weak calves in beef cows. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 10:1-13.

Msolla P.M., Wiseman A. & Selman I.E. 1981. The prevalence of serum neutralized antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland. *J. Hyg.* 86:209-215.

Muller S.B.K., Ikuno A.A., Campos M.T., Machado J.S. & Ribeiro L.O.C. 1981. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/ vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo.** 47(2): 1192-1196.

Muylkens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F. & Thiry E. 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38:181-209.

Okuda L.M., Aguiar D.M., Cavalcanti G.T., Stefano E., Del Fava C., Pituco E.M., Labruna M.B., Camargo L.M.A. & Genari S.M. 2005. **Inquérito soropidemiológico do herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) no município de Monte Negro, Estado de Rondônia, Brasil.**

Pastoret P., Thiry E., Brochier B. & Derbover B. 1982. Bovid Herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. *Annual Record Veterinary.* 13:221-235.

Philpott M. 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.*, 149(4):339-369.

Pituco E.M., De Stefano E., Passos E.C., Mavridis S. C. & Consales C. A. 1993. Diagnóstico sorológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)/ Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) no período de 1988 a 1992. In: Reunião Anual do Instituto Biológico 6. São Paulo. **Resumos...** Instituto Biológico, São Paulo. p. 16.

Pituco E. M. & Fava C. 1998. Situação Do BHV-1 na América do Sul. In: Simpósio Internacional sobre herpesvirus bovino (tipo 1 e 5) **Anais...** Santa Maria. p. 75-87.

Porterfield J.S. 1989. *Andrews' viruses of vertebrates.* 5 ed. Baillière Tindall, London

Pospisil Z., Krejčí J., Jínek, P., Lány P., Zendulková D. & Cíhal P. 1996. Development of a disease control program based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.* 53(1-2):199-206.

Quincozes C.G. 2005. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvirus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos Municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas Pelotas, Rio Grande do Sul. 117p.

Ravazzolo A.P., Pizzol M.D. & Moojen V. 1989. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.** 17:89-95.

Richtzenhain J.J., Barbarini O., Umehara O., De Gracia A.S., Cortez A., Heinemann M.B. & Ferreria F. 1999. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina: Levantamento sorológico nos Estados de Minas Gerais, Mato grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. **Arq. Inst. Biol.** 66(1):83-88.

Riet-Correa F., Moojen V., Roehe P.M. & Weiblen R. 1996. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, 26(2):323-332.

Rocha M.A., Gouveia A.M.G., Lobato Z.I.P. & Leite R.C. 2001. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.** 53(6):645-647.

Rock D.L. 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. **Seminars in Virology.** 5:233-240.

Roehe P.M., Teixeira M.B., Esteves P.A., Melo S.V., Almeida R.S., D'Arce R.C.F., Silva T.C., Lemos R.A. & Oliveira L.G. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: Simpósio Internacional sobre herpesvirus bovino (tipo 1 e 5) E vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p 89-96.

Roizman B. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. **Arch.Virol.** 123:432-445.

Roizman B. 1996. Herpesviridae. In Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. eds. *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. 71. p. 2221-2230.

Silva F.F., Castro R.S., Melo L.E.H., Abreu S.R.O. & Muniz A.M.M. 1995. Anticorpos neutralizantes contra o HVB-1 em bovinos do Estado de Pernambuco. **Arq. Bras. Méd.Vet. Zoot.** 47(4):597-599.

Silva L.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2007. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvirus bovino tipo 1. **Cienc. Rural.** 37(5):1471-1474.

Schwytzer M., Ackermann M. 1996. Molecular Virology of ruminant herpesviruses. **Vet. Microbiol.** 53:17-29.

Smith G.A., Young P.L. & Reed K.C. 1995. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Arch. Virol.** 140:599-603.

Solis-Calderon J.J., Segura-Correa V.M., Segura-Correa J.C. & Alvarado-Islas. 2003. Seroprevalence and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, México. **Prev. Med. Vet.** 57:199-208.

Takiuchi E., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2001. Herpesvirus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Cienc. Agr.** 22(2):203-209.

Tomich R.G.P., Pellegrini A.O., Serra C.V., Ribeiro M.F.B., Passos L.M.F. & Barbosa-Stancioli, E.F. 2004. Estudo de doenças bovinas em assentamentos rurais do município de Corumbá, MS - resultados iniciais. IN: Simpósio sobre recursos naturais e sócio econômicos do Pantanal. Corumbá. **Anais...** Disponível em [www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos](http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos) Acesso em: 19 fev. 2008.

Van Donkersgoed J., Babiuk L.A. 1991. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Med.** 86(1):86-94.

Van Engelenburg F.A., Kaashoek M.J., Van Oirschot J.T. & Rijsewijk F.A. 1995. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. **J Gen Virol.** 76:2387-2392.

Van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K., van den Hurk J.V., Babiuk L.A. & Van Donkersgoed, J. 1997. Protective immunity in cattle following vaccination with conventional and marker bovine herpesvirus-1 (BHV1) vaccines. **Vaccine**, 15:36-44.

Van Oirschot J.T., Kaashoek M.J. & Rijsewijk F.A.M. 1996. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Vet. Microbiol.** 53(1-2):43-54.

Van Oirschot J.T. 1998. The BHV-1- Situation in Europe. In Simpósio Internacional sobre herpesvirus bovino (tipo 1 e 5) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS. 69-72.

Van Schaik G., Dijkhuizen A.A., Huirne R.B.M., Schukken Y.H., Nielen M. & Hage H.J. 1998. Risk factors for existence of Bovine Herpes Virus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. **Prev. Vet. Med.** 34:125-136.

- Van Schaik G., Nielen M., Dijkhuizen A.A., Barkema H.W. & Benedictus G. 2002. Probability and risk factors for introduction of infectious disease into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. **Prev. Vet. Med.** 54(3):279-289.
- Vidor T., Halfen D.C., Leite T. E. & Coswig L.T. 1995. Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Cienc. Rural.** 25(3):421-424.
- Vieira S., Brito W.M.E.D., Souza W.J., Alfaia B.T. & Linhares D.C.L. 2003. Anticorpos para o herpesvirus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira.** 4(2):131-137.
- Weiblen R., Kreutz L.C., Canabarro T.F., Schuch L.F. & Rebelato, M.C. 1992. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bull with balanoposthitis. **J. Vet. Diagn. Investig.** 4:341-343.
- Wyler R., Engels M. & Schwyzer M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis / vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittmann G. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. **Kluwer Academic Publishers**, Boston. p.1-72.
- Xia J.Q., Lofstedt R.M., Yason C.V. & Kibenge F.S. 1995. Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridization, polymerase chain reaction and virus isolation. **Res Vet Sci.** 59(2):183-185).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a epidemiologia do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos do estado do Paraná.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a prevalência de propriedades e animais positivos para o BoHV-1 nos circuitos produtores e estado do Paraná.
- Identificar os fatores de risco associados à infecção pelo BoHV-1 no estado do Paraná.
- Identificar os fatores de risco associados à infecção pelo BoHV-1 na região oeste do estado do Paraná.

**Fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região oeste do estado do Paraná.**

---

Artigo publicado no periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(3):127-134. 2008.

### 3. ARTIGO I

---

## FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO HERPESVÍRUS BOVINO 1 EM REBANHOS BOVINOS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ<sup>1</sup>

Juliana A. Dias<sup>2</sup>, Amauri A. Alfieri<sup>3</sup>, Kerlei C. Médici<sup>3</sup>, Julio C. Freitas<sup>3</sup>, José S. Ferreira Neto<sup>4</sup> e Ernst E. Müller<sup>3</sup>.

**ABSTRACT.-** Dias J.A., Alfieri, A.A., Medici, K.C., Freitas, J.C., Ferreira-Neto J.S. & Müller E.E. **Risk factors for bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the West region of Parana State.** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid 380, Londrina, PR 86051-990. Caixa postal 6001. E-mail:muller@uel.br.

The aim of this study was to determine the prevalence of positive herds and to identify the risk factors for BoHV-1 infection in breeding cattle herds in the Western region of Parana State. The statistic delineation, the serum samples and information regarding the selected farms, were the same employed in the study of bovine brucellosis for Parana State in the context of National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis. The sampling was performed in two stages. Blood samples were collected from 1930 females aged  $\geq 24$  months from 295 nonvaccinated herds. Serum samples were tested for antibodies against BoHV-1 using an indirect ELISA. The epidemiological questionnaire was applied on all the selected farms and aimed to obtain epidemiological data. Hundred ninety of the 295 herds were positive for BoHV-1, presenting prevalence of positive herds of 64.41% [58.65-

---

<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid 380, Londrina, PR 86051-990. Caixa postal 6001. E-mail:muller@uel.br.

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo (VPS-USP).

69.87%]. The number ( $\geq 23$ ) of females aged 24 months (OR=2.22; IC: 1.09-4.51), purchased cattle (OR=2.68; IC: 1.48-4.82), use of common grass (OR=5.93; IC: 1.31-26.82), history of abortion in the last 12 months (OR=2.37; IC: 1.09-5.16) and presence of wildlife animals (OR=8.86; IC: 1.11-70.73) were identified as risk factors for BoHV-1 infection in the multivariate logistic regression. These results indicate that BoHV-1 infection is widespread in the studied region and that factors related to the herd characteristic and management are associated with the infection.

**Index terms:** Prevalence, epidemiology, risk factors, bovine herpesvirus 1, indirect ELISA.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de rebanhos positivos (focos) e identificar os fatores de risco que possam estar associados com a infecção pelo herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos com atividade reprodutiva, na região oeste do estado do Paraná. O delineamento estatístico, amostras de soro e informações referentes às propriedades foram as empregadas para o estudo da brucelose bovina no estado do Paraná dentro do contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Foram avaliadas 1930 fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 295 rebanhos não vacinados contra o BoHV-1. Para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BoHV-1, foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Em cada propriedade foi aplicado um questionário epidemiológico, afim de obter informações epidemiológicas e práticas de manejo empregadas. Dos 295 rebanhos analisados, 190 foram considerados positivos para o BoHV-1, com a prevalência de rebanhos de 64,41% (I.C.95% = 58,65-69,87%). As variáveis consideradas fatores de risco para a infecção pelo BoHV-1 na análise de regressão logística multivariada foram: i) número ( $\geq 23$ ) fêmeas com idade  $\geq 24$  meses (OR=2,22; IC: 1,09-4,51); ii) compra de reprodutores (OR=2,68; IC: 1,48-4,82); iii)

uso de pastagens comuns (OR=5,93; IC: 1,31-26,82); iv) histórico de abortamento nos últimos 12 meses (OR=2,37; IC: 1,09-5,16); v) presença de animais silvestres (OR=8,86; IC: 1,11-70,73). Estes resultados indicam que a infecção pelo BoHV-1 está amplamente distribuída na região estudada e que fatores relacionados às características das propriedades e ao manejo estão associados à infecção.

**Termos de indexação:** Prevalência, epidemiologia, fator de risco, herpesvírus bovino 1, ELISA indireto.

## INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) é considerado um dos principais patógenos de bovinos sendo responsável por grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária (Kirkbride 1985). O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e é subdividido nos subtipos BoHV-1.1, isolados de problemas respiratórios, reprodutivos e conjuntivites, e BoHV-1.2, mais freqüentemente isolados em infecções genitais (vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa-IPV/BPV) (Metzler et al. 1985, Magyar et al. 1993).

As infecções pelo BoHV-1 podem contribuir com reduções consideráveis nos índices de reprodução dos rebanhos infectados. Na dependência do período gestacional e das estruturas envolvidas, a infecção pode determinar, mortalidade embrionária precoce e/ou tardia, com repetição de cio a intervalo regular ou irregular, abortamento, natimortalidade e o nascimento de bezerros fracos. O aparelho reprodutivo também é bastante susceptível aos efeitos da infecção pelo BoHV-1, podendo ocorrer quadros de vulvovaginite, endometrite, salpingite e ooforite, que apresentam a infertilidade temporária como principal consequência (Bowen et al. 1985, Kirkbride 1985, Miller 1991, Takiuchi et al. 2005).

O BoHV-1, assim como outros membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, estabelece infecção latente em gânglios sensoriais, podendo ser periodicamente reativado sob condições de estresse ou tratamentos com corticóides (Ackermann 1982). O vírus em latência não é detectado por procedimentos virológicos convencionais e o animal pode apresentar subseqüentes e intermitentes episódios de excreção viral, não acompanhados de sinais clínicos, resultando na disseminação e perpetuação da infecção nos rebanhos (Pastoret et al. 1982).

O BoHV-1 está amplamente distribuído e com alta freqüência em rebanhos bovinos de todo o mundo (Mickelsen & Evermann 1994). Evidências sorológicas demonstram a presença, bem como a alta freqüência, das infecções pelo BoHV-1 também nos rebanhos brasileiros. Dados regionais, obtidos a partir de inquéritos sorológicos, revelam a expressiva disseminação do vírus em rebanhos de corte e leite. Mueller et al. (1981) detectaram 42,2% de animais reagentes no Estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul foram descritas freqüências de soropositividade de 81,7% (Ravazzolo et al. 1989), 31,9% (Vidor et al. 1995) e 18,8% (Lovato et al. 1995). Takiuchi et al. (2001) verificaram uma freqüência de animais soropositivos para o BoHV-1 variando entre 52,4 a 81,7%, em rebanhos não vacinados, provenientes dos estados de São Paulo, Paraná, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.

No estado do Paraná, em um estudo considerando propriedades com histórico de problemas reprodutivos, 41,9% dos animais e 90,5% dos rebanhos com aptidão leiteira foram positivos para o BoHV-1. Em rebanhos de corte, a freqüência de animais sororreagentes foi 50,8%, com 100% de rebanhos positivos (Médici et al. 2000).

Os estudos realizados no Paraná, envolvendo a epidemiologia do BoHV-1 se restringiram a propriedades com histórico de problemas reprodutivos, e se caracterizaram pela ausência de delineamento amostral, não sendo possível estabelecer o real impacto e a

frequência dessa infecção. Com o propósito de elucidar a situação epidemiológica da infecção pelo BoHV-1 na região oeste do estado do Paraná, este trabalho teve o objetivo de caracterizar as propriedades com rebanhos bovinos com atividade reprodutiva, determinar a prevalência de focos e identificar os fatores de risco potencialmente associados com a infecção.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População estudada**

Este estudo transversal foi realizado na região oeste do estado do Paraná (Fig.1), de acordo com o delineamento amostral desenvolvido no estudo da soropidemiologia da brucelose bovina no estado, no contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT). Esta região inclui os núcleos regionais de administração da Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SEAB-PR) de Cascavel e Toledo, e envolve 48 municípios com 33.451 propriedades com exploração de bovídeos, 1.057.930 bovídeos e 616.012 fêmeas com idade superior a 2 anos (Paraná 2001).

### **Delineamento amostral.**

A amostragem foi realizada em duas etapas. Primeiro, a seleção aleatória de um número pré-estabelecido de propriedades, que representam as unidades primárias de amostragem. Dentro das unidades primárias, foi amostrado de forma aleatória um número pré-estabelecido de animais (unidades secundárias), com a finalidade de determinar o estado sanitário do rebanho.

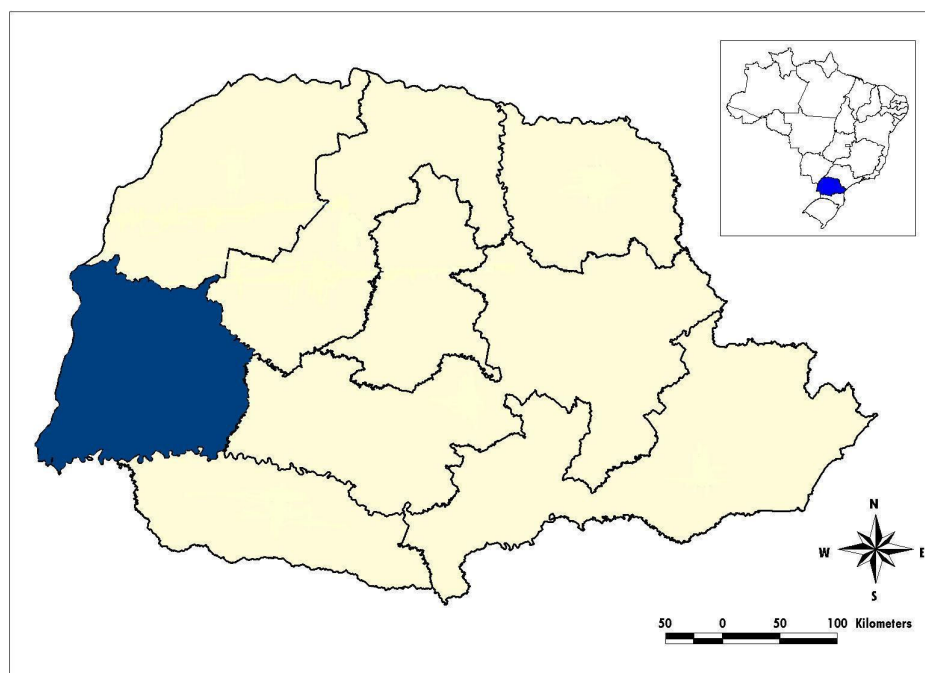


Figura 1 – Mapa do estado do Paraná demonstrando a região oeste, alvo do presente estudo.

O cálculo do número de rebanhos foi determinado pelo grau de confiança do resultado, pelo nível de precisão desejado e pelo valor da prevalência esperado (Noordhuizen et al. 1997), sendo condizente com a capacidade operacional e financeira do Serviço Oficial do estado do Paraná e utilizando-se a fórmula para amostras simples aleatórias, segundo Thrusfied (1995) e Noordhuizen et al. (1997):

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot \sqrt{P(1-P)}}{d^2}$$

Onde:

$n$  = número de propriedades amostradas por circuito produtor;

$Z_{\alpha}$  = valor da distribuição normal para o grau de confiança de 95%;

$P$  = prevalência esperada de 50%;

$d$  = precisão, fixada em 5%.

A seleção aleatória dos rebanhos, para cada circuito produtor, foi realizada a partir do cadastro de propriedades existentes junto à base da Unidade Veterinária Local correspondente. Para cada município, as propriedades existentes foram numeradas e os dados armazenados em planilhas do programa Microsoft Excel 2000<sup>®</sup>. As propriedades a serem amostradas foram selecionadas aleatoriamente, considerando o número de propriedades do município e o número de propriedades amostradas no circuito produtor.

O planejamento amostral para as unidades secundárias visou estimar o número mínimo de animais a serem examinados, dentro de cada propriedade, de forma a permitir a sua classificação como foco ou não do BoHV-1.

O número de animais selecionados de cada rebanho foi determinado utilizando o programa Herdacc<sup>®</sup>, *version 3* (University of Guelph), considerando os valores de sensibilidade e especificidade agregada dos procedimentos de diagnóstico, prevalência intra-rebanho e erro padrão (Paraná 2001).

Em rebanhos constituídos por até 99 fêmeas, com idade igual ou superior a 24 meses, foram amostrados 10 animais ou todas as fêmeas nesta faixa etária nos rebanhos com menos de 10 animais. Em rebanhos constituídos por mais de 99 fêmeas, foram amostradas 15 fêmeas (Paraná 2001). A seleção dos animais dentro da propriedade foi aleatória utilizando-se dois métodos, a amostragem aleatória simples ou a aleatória sistemática.

Foram analisadas um total de 1930 fêmeas com idade  $\geq 24$  meses, provenientes de 295 rebanhos não vacinados contra o BoHV-1.

### **Colheita da amostras de sangue e dados epidemiológicos.**

Os trabalhos a campo consistiram na colheita de sangue e preenchimento de um questionário epidemiológico. A colheita de sangue foi realizada por médicos veterinários e técnicos da SEAB-PR, no período de dezembro de 2001 a julho de 2002, por meio de punção

da veia jugular utilizando agulha descartável estéril e tubo com vácuo, previamente identificado. As amostras de soro obtidas foram armazenadas em microtubos de plástico e congeladas a -20°C. O questionário epidemiológico foi aplicado em todas as propriedades selecionadas e teve por objetivo obter informações de sistemas de produção e de manejo.

### **Teste sorológico**

Para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BoHV-1 foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto.

Células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) foram utilizadas para a produção do antígeno (BoHV-1) e para a elaboração das técnicas de soroneutralização e ELISA indireto. As células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM, Invitrogen, EUA), suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB –Invitrogen, EUA) livre de micoplasmas e vírus, 55 mg/mL de gentamicina (Sigma® Co., EUA), 2,5 mg/mL de anfotericina B (Sigma® Co., EUA) e monitoradas pela técnica da RT-PCR quanto à ausência do vírus da diarréia viral bovina, de acordo com Pilz et al. (2007).

Para a produção do BoHV-1 foi utilizada a estirpe *Los Angeles* (LA; Madin et al. 1956) amplificada em cultivo celular em meio DMEM suplementado com 1% SFB. O título viral da suspensão foi calculado em dose infecciosa 50% para cultura de tecidos (50% *tissue culture infective doses* –TCID<sub>50</sub>). O BoHV-1 foi utilizado tanto para a produção de antígeno para a técnica de ELISA indireto quanto para a realização da técnica de SN. O método utilizado para a produção de antígeno-BoHV-1 foi o descrito por Ferreira et al. (2005). A microtécnica de SN (Bitsch 1978) foi realizada para verificar a presença ou ausência de anticorpos para o BoHV-1 nos soros sanguíneos de referência, positivos e negativos, utilizados para determinação do ponto de corte e na validação do ELISA indireto para a partida de antígeno produzida.

A técnica de ELISA indireto foi realizada de acordo com o método descrito por Ferreira et al. (2005).

Para minimizar as variações dos resultados da densidade óptica (DO) obtidos em cada microplaca, a DO de cada soro foi expressa como valor de R (Relação). A determinação do valor de R foi calculada com base nas DOs de 10 soros controles positivos e 10 soros controles negativos, segundo Biondi et al. (1996). Foi obtido nos soros negativos o maior valor de R de 0,102. O ponto de corte foi definido em 0,230, considerando o maior valor de R acrescido de 3 desvios padrão.

A determinação da sensibilidade e especificidade do ELISA indireto foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Coggon et al. (1983). Foram utilizados 50 soros positivos e 50 soros negativos na SN, obtendo-se a sensibilidade de 98% e especificidade de 93%. O valor de kappa calculado foi 0,954.

### **Análise de dados.**

As informações dos questionários, assim como o resultado da sorologia e a condição da propriedade, foram armazenados num banco de dados utilizando o programa Microsoft Access®. A propriedade foi considerada positiva (foco) para a presença do BoHV-1 se apresentasse pelo menos um animal positivo em propriedades com até sete fêmeas; dois animais em rebanhos de 8 a 99 fêmeas e três animais em propriedades com mais de 99 fêmeas. Estes critérios foram estabelecidos utilizando o programa Herdacc®, *version 3* (University of Guelph) considerando o tamanho da população, prevalência intra-rebanho de 50%, sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico utilizado (ELISA indireto), de forma a obter sensibilidade e especificidade de rebanho superiores a 90%.

Considerando-se que a amostra de unidades primárias no circuito produtor foi aleatória sistemática (Cochran 1977), a prevalência aparente de focos do BoHV-1 foi

calculada utilizando-se como parâmetros o número de focos e o número de propriedades amostradas (Dean et al. 1994). Os cálculos das prevalências de focos e os respectivos intervalos de confiança foram realizados com o auxílio do programa EpiInfo 6.04d (Dean et al. 1994).

As variáveis relacionadas no questionário epidemiológico permitiram o estudo dos fatores de risco. Dentre elas, foram analisadas como possíveis fatores de risco: tipo de criação; uso de inseminação artificial; raça predominante; número total de fêmeas existentes; número de fêmeas com idade  $\geq 24$  meses; presença de espécies silvestres de vida livre; destino de fetos e placentas; compra ou venda de machos e/ou fêmeas para reprodução; pastagens em comum com outras propriedades; prática de aluguel de pasto; piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto; e assistência veterinária.

As categorias das variáveis foram organizadas de modo a apresentarem-se em escala crescente de risco, segundo informações da literatura (Kahrs 1977, Wyler et al. 1989, Wentink et al. 1993, Van Schaik et al. 1998, Van Schaik et al. 2002). Quando necessário, realizou-se a recategorização dessas variáveis. A categoria de menor risco foi considerada como base para a comparação das demais categorias. As variáveis quantitativas foram recategorizadas em quartis.

A análise univariada foi realizada para verificar a associação entre o *status* do rebanho para o BoHV-1 (ausência de animais positivos =0; presença de um, dois ou três animais soropositivos, de acordo com os critérios descritos anteriormente =1) e variáveis de risco, utilizando o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher. As variáveis com valor de  $p < 0,2$  na análise univariada foram incluídas na análise de regressão logística multivariada (Hosmer & Lemeshow 1989). As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS *version* 9.0 (SPSS INC. 1999a).

## RESULTADOS

### Caracterização da amostra

O número de animais nas propriedades selecionadas variou entre 1 e 3077, apresentando mediana de 15 animais. A dispersão do número de bovinos, segundo o sistema de exploração zootécnica das propriedades selecionadas está apresentada na Fig. 2.

Na amostra estudada, 76,9% das propriedades de corte eram de criação extensiva, com predomínio (50%) de raças zebuínas. A aquisição de animais para a reprodução era realizada em 71% das propriedades, sendo 65,4% proveniente diretamente de outras fazendas.

Dos rebanhos leiteiros amostrados, as criações intensivas predominaram em 60%, com 48,5% dos rebanhos constituídos por raças européias especializadas na produção de leite. A compra de reprodutores era realizada por 35,6% das propriedades, sendo 24,5% diretamente de outras propriedades. A média de produção na região é de 61,09L/leite/dia.

As propriedades mistas caracterizaram-se por criações extensivas (63,1%), com predomínio (73,9%) de animais de composição racial mista. A inseminação artificial era utilizada em 15,3% das propriedades e 11,7% apresentavam mecanização de ordenha. A compra de reprodutores era realizada em 37,8%, predominantemente de outras propriedades.

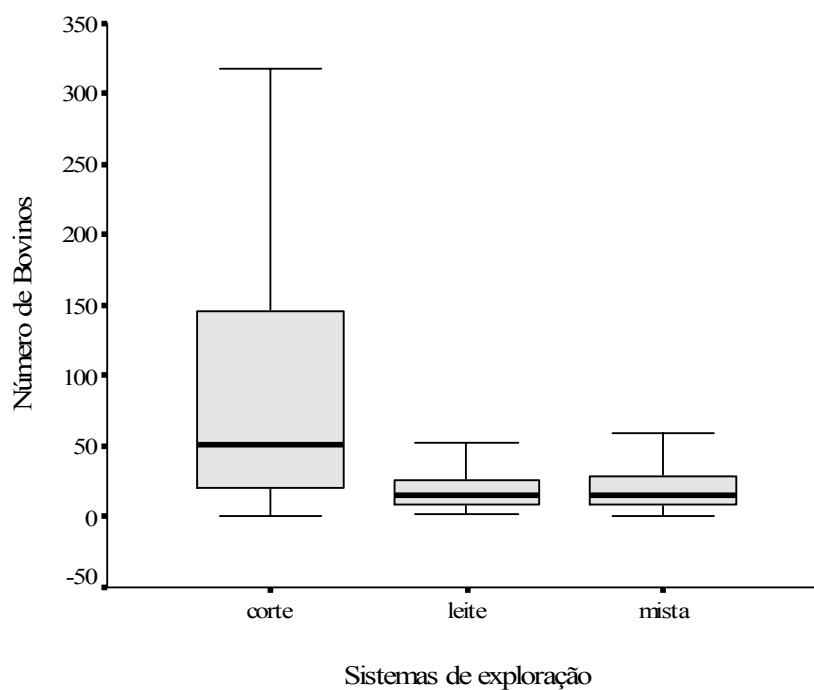


Figura 2 – Diagrama de blocos mostrando a dispersão do tamanho dos rebanhos de acordo com o sistema de exploração na região oeste do estado do Paraná.

### **Prevalência de propriedades positivas**

Dos 295 rebanhos analisados, 190 foram positivos para o BoHV-1, representando uma prevalência de 64,41% (I.C.95% = 58,65-69,87%).

No Quadro 1 estão apresentados os dados de prevalência de focos de BoHV-1 segundo o sistema de exploração zootécnica na região oeste do estado do Paraná

### **Análise dos fatores de risco**

No Quadro 2 estão demonstradas as variáveis relacionadas às características de propriedades e de manejo mais associadas à presença ou ausência da infecção pelo BoHV-1 nos rebanhos da região oeste do estado. Destas variáveis selecionadas, foram considerados

fatores de risco na análise de regressão logística multivariada: i) número ( $\geq 23$ ) fêmeas com idade  $\geq 24$  meses ( $p=0,027$ ); ii) compra de reprodutores ( $p=0,001$ ); iii) pasto comum ( $p=0,021$ ); iv) histórico de aborto nos últimos 12 meses ( $p=0,030$ ) e v) presença de animais silvestres ( $p=0,040$ ) (Quadro 3).

**Quadro 1** – Prevalência aparente de focos do BoHV-1 estratificada por tipo de exploração na região oeste do estado do Paraná.

Sistemas de exploração*	Propriedades amostradas	Propriedades positivas	Prevalência	
			%	IC 95%**
Corte	25	22	88,00	[68,78-97,45]
Leite	160	100	62,50	[54,51-70,02]
Misto	109	67	61,47	[51,66-70,63]

\*Uma propriedade não informou o tipo de exploração.

\*\*Intervalo de confiança de 95%

**Quadro 2** – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para o BoHV-1 em rebanhos bovinos da região oeste do estado do Paraná.

Variáveis <sup>a</sup>	Rebanhos avaliados		P
	Negativo (n=105)	Positivo (n=190)	
<b>Relacionadas à população e propriedades</b>			
<b>Tipo de criação</b>			<b>0,344</b>
( 1 ) extensivo <sup>b</sup>	58	91	
( 2 ) semi-confinado / confinado	47	93	
<b>Tipo de exploração<sup>c</sup></b>			<b>0,035</b>
( 1 ) leite <sup>b</sup>	60	100	
( 2 ) corte	3	22	
( 3 ) mista	42	67	
<b>Raça predominante</b>			<b>0,483</b>
( 1 ) puras	43	69	
( 2 ) outras	59	113	
<b>Número de fêmeas bovinas<sup>c</sup></b>			<b>0,004</b>
( 0 ) < 23 fêmeas <sup>b</sup>	101	162	
( 1 ) $\geq 23$ fêmeas	4	28	

<b>Número de fêmeas acima de 24 meses <sup>c</sup></b>			<b>0,006</b>
( 0 ) < 13 fêmeas <sup>b</sup>	99	158	
( 1 ) ≥ 13 fêmeas	6	32	
<b>Relacionadas a fatores de manejo</b>			
<b>Presença de animais silvestres <sup>c</sup></b>			<b>0,008</b>
( 0 ) não <sup>b</sup>	104	174	
( 1 ) sim	1	16	
<b>Uso da inseminação artificial <sup>c</sup></b>			<b>0,020</b>
( 0 ) só inseminação artificial <sup>b</sup>	21	32	
( 1 ) inseminação artificial / monta natural	24	22	
( 2 ) não usa	58	131	
<b>Compra animais para reprodução <sup>c</sup></b>			<b>0,000</b>
( 0 ) não <sup>b</sup>	79	98	
( 1 ) sim	24	90	
<b>Vende animais para reprodução <sup>c</sup></b>			<b>0,026</b>
( 0 ) não <sup>b</sup>	95	157	
( 1 ) sim	7	30	
<b>Destino do aborto</b>			<b>0,618</b>
( 0 ) enterra/joga/queima <sup>b</sup>	37	60	
( 1 ) deixa produtos de abortos na pastagem	23	44	
<b>Aluguel pasto <sup>c</sup></b>			<b>0,043</b>
( 0 ) não <sup>b</sup>	101	170	
( 1 ) sim	4	20	
<b>Pasto comum <sup>c</sup></b>			<b>0,005</b>
( 0 ) não <sup>b</sup>	103	169	
( 1 ) sim	2	21	
<b>Piquetes de parição <sup>c</sup></b>			<b>0,079</b>
( 0 ) não <sup>b</sup>	89	146	
( 1 ) sim	13	39	
<b>Assistência veterinária</b>			<b>0,275</b>
( 0 ) sim <sup>b</sup>	56	90	
( 1 ) não	41	87	
<b>Relacionadas a fatores biológicos</b>			
<b>Presença de aborto <sup>c</sup></b>			<b>0,004</b>
( 0 ) não <sup>b</sup>	92	144	
( 1 ) sim	10	45	

<sup>a</sup> Algumas perguntas não foram respondidas pelos proprietários

<sup>b</sup> Categoria *baseline*

<sup>c</sup>  $p < 0,20$  na análise univariada e incluídas no modelo de regressão logística multivariada

**Quadro 3** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados ao BoHV-1 em rebanhos com atividade reprodutiva da região oeste do estado do Paraná.

Variáveis	P	OR	IC 95%
Número ≥ 13 fêmeas acima de 24 meses	0,027	2,222	[1,095;4,510]
Compra de reprodutores	0,001	2,679	[1,488;4,824]
Pasto comum com outras propriedades	0,021	5,931	[1,312;26,816]
Histórico de aborto nos últimos 12 meses	0,030	2,370	[1,088;5,164]
Presença de animais silvestres	0,040	8,858	[1,109;70,733]

$R^2=21,0\%$

Nas propriedades especializadas na pecuária de corte, não houve associação das variáveis estudadas com a presença do BoHV-1 na análise de regressão logística multivariada. Nos rebanhos leiteiros, o fator de risco identificado na análise de regressão logística multivariada foi compra de reprodutores (OR=2,110; IC: 1,037-4,293), e nas propriedades de exploração mista o número ≥ 12 fêmeas (≥ 24 meses) na propriedade (OR=7,738; IC: 2,164-27,676).

## DISCUSSÃO

No período e região estudados, foi verificada uma prevalência de focos do BoHV-1 de 64,41% (I.C.95% = 58,65-69,87%). No estado do Paraná, os trabalhos realizados anteriormente para o estudo epidemiológico do BoHV-1 não foram caracterizados por delineamento amostral. Um estudo envolvendo propriedades com problemas reprodutivos demonstrou a frequência de 92,6% de rebanhos positivos (Médici et al. 2000).

Barbosa et al. (2005) estudaram três estratos no Estado de Goiás, caracterizados pelos tipos de exploração corte, leite e misto, utilizando como base para o cálculo das

amostras, o delineamento do PNCETB. Foi verificada prevalência de focos do BoHV-1 de 98,5% (I.C.95% = 97,5-99,2%), estimativa que se assemelha a estudos em propriedades com problemas reprodutivos. Considerando que a amostragem de propriedades e animais foi aleatória, a prevalência estimada de focos é consideravelmente mais alta que a determinada no presente trabalho. Esta diferença pode ser explicada, parcialmente, pelo delineamento utilizado, em que foi realizada a amostragem equitativa de propriedades nos diferentes tipos de exploração. Propriedades de corte se caracterizam por grandes rebanhos e geralmente apresentam maior prevalência do BoHV-1 em relação aos outros sistemas de exploração (Médici et al. 2000, Melo et al. 2002, Faria et al. 2003). No presente estudo, as propriedades de corte corresponderam a apenas 8,5% do total de propriedades amostradas e desta forma a prevalência determinada foi menor considerando a menor proporção desse tipo de exploração.

A frequência de rebanhos positivos para o BoHV-1, estratificada por tipo de exploração na região oeste do estado do Paraná, demonstrou uma maior prevalência (88%) em rebanhos especializados na pecuária de corte. Estudos realizados em rebanhos de corte com problemas reprodutivos nos Estados do Rio Grande do Sul (Vidor et al. 1995) e Paraná (Médici et al. 2000), encontraram frequências de 71,3% e 100%, respectivamente. Uma característica no manejo deste tipo de exploração pode estar relacionada à menor taxa de reposição das matrizes em relação às propriedades leiteiras. Com isso, a frequência da infecção nos rebanhos de corte pode ser influenciada, principalmente, pela permanência de animais soropositivos no plantel por maior período de tempo.

As propriedades de corte selecionadas neste trabalho apresentaram os maiores (mediana=51) rebanhos da amostra e 71% informaram a compra de reprodutores. Vários autores citam a compra de animais em período de incubação ou nas fases aguda ou latente da infecção pelo vírus como principal fator de introdução do BoHV-1 no rebanho (Msolla et al.

1981, Pastoret et al. 1984). Desta forma, as propriedades abertas apresentariam um maior risco de infecção pelo BoHV-1.

A prevalência de focos do BoHV-1 em rebanhos de leite e misto foi de 62,50% (I.C.95% = 54,51-70,02%) e 61,47% (I.C.95% = 51,66-70,63%), respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Lovato et al. (1995) em nove bacias leiteiras do Estado do Rio Grande do Sul, em que verificaram a prevalência de propriedades positivas de 54,5%. Médici et al. (2000) analisando rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos no Estado do Paraná, verificaram a frequência de 90,5%.

A diferença entre as prevalências encontradas em propriedades de corte e leite poderia ser também explicada pelo manejo reprodutivo empregado nos dois sistemas de produção. O sêmen é uma das principais vias de eliminação do vírus, e a utilização da monta natural como método de reprodução envolveria maior probabilidade de infecção comparada à inseminação artificial. Nas centrais de inseminação artificial, normas de controle sanitário são exigidas com o objetivo de garantir a ausência de microrganismos patogênicos no sêmen. Das propriedades de corte amostradas nesta região, 92% utilizavam apenas a monta natural como método de reprodução, e nos rebanhos de leite este manejo era utilizado em 54,6% das propriedades selecionadas.

A análise multivariada dos fatores de risco para a infecção pelo BoHV-1 em rebanhos bovinos da região oeste do estado do Paraná demonstrou que propriedades com número  $\geq 13$  de fêmeas ( $\geq 24$  meses) ( $p=0,027$ ) possui maiores chances de serem positivas para o BoHV-1 que propriedades com rebanhos menores. Essa variável se manteve no modelo na análise das propriedades de exploração mista. Miller (1991) e Mc Dermott et al. (1997) reportaram que rebanhos maiores, ou com alta densidade de animais, estão associados à alta probabilidade de infecção pelo BoHV-1. A associação entre o tamanho do rebanho e a soropositividade para o BoHV-1 pode ser atribuída a outras variáveis, fortemente relacionadas

com o tamanho de rebanho, como a frequência de compra de animais, participação em eventos agropecuários, visitas profissionais e presença de trabalhadores regulares e temporários nas propriedades (Van Schaik et al. 1998).

A compra de reprodutores ( $p=0,001$ ) foi identificada neste estudo como fator de risco para a doença. Van Schaik et al. (1998) demonstraram que propriedades que compram animais teriam 3,5 vezes mais chances de serem positivas que propriedades fechadas, considerando uma média de compra de 4,5 animais por ano. Esses dados evidenciam a importância dessa variável, quando a aquisição é realizada sem controle sanitário, como fator de introdução da doença em propriedades livres.

O intercâmbio de animais entre propriedades pode favorecer o contato entre susceptíveis e infectados. A transmissão pode ocorrer por contato com secreções nasais de animais infectados e inalação de aerossóis contaminados, por transmissão venérea ou indiretamente através de água e alimentos contaminados (Engels & Ackermann 1996). Neste estudo, propriedades que utilizavam pastagens em comum com outras propriedades apresentaram 5,9 vezes mais chances de serem positivas do que rebanhos que não praticavam esse manejo.

Embora a transmissão interespecie não seja considerada importante na disseminação do vírus, outras espécies animais podem atuar como possíveis reservatórios. Cervídeos inoculados experimentalmente com o BoHV-1 apresentaram quadros respiratórios e eliminação intermitente do vírus em animais imunodeprimidos (Thorsen et al., 1977). A presença de animais silvestres ( $p=0,019$ ) identificada como fator de risco, evidencia a possibilidade de contato desses animais com bovinos da região oeste do estado. Na região estudada está localizado o Parque Nacional do Iguaçu, e quatorze municípios avaliados estão localizados no entorno do parque. Aguirre et al. (1995) realizaram um estudo sorológico em cervídeos silvestres em parques nacionais nos EUA e detectaram soropositividade para o

BoHV-1 de 32% para a espécie *mule deer* e 46% para a espécie *wapiti*. No Brasil, um estudo sorológico para o BoHV-1 foi realizado em cervos do pantanal da região do Pontal do Paranapanema. Foram avaliados 121 soros pela técnica de SN, obtendo 2,5% de animais sororreagentes com títulos de até 128 (Alfieri 2007- comunicação pessoal).

O abortamento é a manifestação clínica de diversas enfermidades, inclusive da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina. Neste estudo, o histórico de aborto foi associado à positividade de rebanhos ao BoHV-1, demonstrando que na região estudada esse vírus pode ser o agente etiológico e deve ser incluído no diagnóstico diferencial de problemas reprodutivos.

A alta prevalência de focos do BoHV-1 nos rebanhos, no período e região geográfica avaliados, indica que o vírus está amplamente distribuído, principalmente nos rebanhos de corte. A análise de fatores de risco associados à infecção pelo BoHV-1 na região oeste do estado indica que as medidas de controle devem focar nos cuidados referentes à compra de animais e desestimular o contato indireto entre propriedades. A introdução de animais em propriedades livres deve ser precedida da realização de testes sorológicos e medidas rígidas de quarentena. Rebanhos livres devem evitar contato direto e indireto com bovinos originados de rebanhos que possuem histórico sanitário desconhecido, a fim de reduzir de forma considerável o risco de introdução do vírus.

Os dados epidemiológicos obtidos neste estudo poderão auxiliar a planificação de estratégias de controle fundamentada nos resultados da análise dos fatores de risco associados à infecção pelo BoHV-1 na região oeste do estado do Paraná.

**Agradecimentos.-** Os autores agradecem à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB-PR) e Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo auxílio no delineamento amostral, colheita de amostras e dados epidemiológicos, e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS-USP) pelo auxílio na elaboração do questionário

epidemiológico e análise dos dados. Este trabalho teve o suporte financeiro concedido pela CAPES, CNPq, FINEP e Fundação Araucária (FAP/PR).

## **REFERÊNCIAS**

Ackermann M., Peterhans E. & Wyler R. 1982. DNA of bovine herpesvirus 1 in trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 4:36-40.

Aguirre A.A., Hansen D.E., Starkey E.E. & McLean R.G. 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Prev. Med. Vet.* 21:313-322.

Barbosa A.C.V.C., Brito W.M.E.D. & Alfaia B.T. 2005. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Cienc. Rural.* 35(6):1368-1373.

Biondi G.F., Mucciolo R.G., Nunes C.M. & Richtzenhain L.J. 1996. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect Elisa employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. *Vet. Parasitol.* 64:261-266.

Bowen R.A., Elsdon R.P. & Seidel S.E. 1985. Herpesvirus bovine type 1-abortion. *Am. J. Vet. Res.* 46:1095-1097.

Bitsch V. 1978. The modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta Vet. Scan.* 19:497-505.

Cochran W.G. 1997. Sampling techniques. 3<sup>a</sup>.ed. New York: John Wiley & Sons. 428p.

Coggon T., Rose G. & Barker D.J. 1983. Measurement, error and bias, p.20-25. In: Coggon T., Rose G.& Barker D.J. (ed.) Epidemiology for the Uninitiated, 3<sup>a</sup> ed. London: BMJ Publishing Group.

Dean A.G., Dean J.A., Colomlier D., Brendel K.A., Smith D.C., Burton A.H., Dicker R.C., Sullivan K., Fagan R.F. & Arner T.G. 1994. Epi-Info, Version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, CDC. 601p.

Engels M. & Ackermann M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesviruses infections. Vet. Microbiol. 53:3-15.

Epiinfo 6.04d. 1994. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention. Disponível em <<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6>>. Acesso em: 10 jul. 2007.

Faria B.O., Freneau G.E., Brito W.M.E.D., Campos Jr. A.C.P. & Vieira S. 2003. Estudo de anticorpos contra o herpes vírus bovino tipo 1 em municípios de entorno de Goiânia, GO. Ver. Bras. Reprod. Anim. 27(3):543-545.

Ferreira M.C., Médici K.C., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2005. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino 1. Semina: Cienc. Agr. 26(3):363-372.

Herdacc, version 3. 1995. Guelph: University of Guelph. Disponível em: <<http://www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/files/herdacc.exe>>. Acesso em: 10 jul. 2007.

Hosmer Jr D.W. & Lemeshow S. 1989. Applied logistic regression. New York: Wiley. 307p.

Kahrs R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171(10):1055-1064.

Kirkbride C.A. 1985. Managing and outbreak of livestock abortion - 2: diagnosis and control of bovine abortion. Vet. Med. 80(5):70-79.

Lovato L.T., Weiblein R., Tobias, F.L. & Moraes M.P. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Cienc. Rural. 25(3):425-430.

Magyar G., Tanyi J., Hornyák A. & Bartha A. 1993. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR/IPV and encephalitis. Acta Vet. Hung. 4(1/2):159-170.

McDermott J.J., Kadohira M., O'Callaghan C.H. & Shoukri M.M. 1997. A comparison of different models for assessing variations in the sero-prevalence of infectious bovine rhinotracheitis by farm, area and district in Kenya. Prev. Vet. Med. 32:219-234.

Médici K.C., Alfieri, A.A. & Alfieri, A.F. 2000. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Cienc. Rural*. 30(2):347-350.

Melo C.B, Lobato Z.I.P., Camargos G.N., Souza N.R.S, Martins & Leite R.C. 2002. Distribuição de anticorpos para herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec*. 54(6):575-580.

Metzler A.E., Matile H., Gassmann V., Engels M. & Wyler R. 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol*. 85:57-59.

Mickelsen W.D. & Evermann J.F. 1994. In utero infections responsible for abortions, stillbirth and birth of weak calves in beef cows. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract*. 10:1-13.

Miller J.M. 1991. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Vet. Med*. 86(1):95-98.

Msolla P.M., Wiseman A. & Selman I.E. 1981. The prevalence of serum neutralized antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland. *J. Hyg*. 86:209-215.

Mueller S.B.K., Ikuno A.A., Machado J.S., Lima R.M.A., Richtzenhain L.J. & Taki E.M. 1981. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa

bovina/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. *O Biológico*. 47(2):55-59.

Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M., & Graat E.A.M. 1997. *Application of quantitative methods in veterinary epidemiology*. Wageningen: Wageningen Press. 445p.

Paraná. 2001. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Departamento da Fiscalização. Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal: manual de procedimentos: estudo soroepidemiológico da brucelose bovina e bubalina. 21p.

Pastoret P., Thiry E., Brochier B. & Derbover B. 1982. Bovid Herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. *Annual Record Veterinary*. 13:221-235.

Pilz D., Alfieri A.F., Lunardi M. & Alfieri A.A. 2007. RT-PCR em pools de soros sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 59(1):1-7.

Ravazzolo A.P., Pizzol M.D. & Moojen V. 1989. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos, em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*. 17:89-95.

SPSS INC. 1999a. *SPSS base 9.0 user's guide*. Chicago. 740p

SPSS.INC. 1999b. SPSS base 9.0 user's guide. Chicago. 1 CD-Rom.

Takiuchi E., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2001. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. Semina: Cienc. Agr. 22(2):203-209.

Takiuchi E., Médici K.C., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2005. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. Res Vet Sci. 79(1):85-8.

Thorsen J., Karstad L., Barret M.W. & Chalmers G.A. 1977. Viruses isolated from captive and free-ranging wild ruminants in Alberta. J. Wildl. Dis. 13:74-79.

Thrusfield M. 1995. Veterinary Epidemiology. 2<sup>a</sup>ed. Cambridge: Blackwell Science. 479p.

Van Schaik G., Dijkhuizen A.A., Huirne R.B.M., Schukken Y.H., Nielen M. & Hage H.J. 1998. Risk factors for existence of Bovine Herpes Virus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. Prev. Vet. Med. 34:125-136.

Van Schaik G., Nielen M., Dijkhuizen A.A., Barkema H.W. & Benedictus G. 2002. Probability and risk factors for introduction of infectious disease into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. Prev. Vet. Med. 54(3):279-289.

Vidor T., Halfen D.C., Leite T.E. & Coswig L.T. 1995. Herpes bovino tipo 1 (HVB-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. Cienc. Rural. 25(3):421-424.

Wentink G.H., Van Oirschot J.T. & Verhoeff J. 1993. Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV1): a review. *Vet. Quart.* 15(1):30-33.

Wylter R., Engels M. & Schwyzer M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis / vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittmann G. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Boston: Kluwer Academic Publishers, p.1-72.

**4. Prevalência, distribuição geográfica e fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos do estado do Paraná, Brasil.**

---

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*

#### 4. ARTIGO II

---

### **PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO HERPESVÍRUS BOVINO 1 (BOHV-1) EM REBANHOS BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.**

**ABSTRACT.** Prevalence, geographical distribution and risk factors for bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) in cattle herds in Parana State, Brazil. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid 380, Londrina, PR 86051-990. Caixa postal 6001. E-mail: muller@uel.br

The prevalence and regional distribution of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) in the state of Paraná are not well characterized. The aim of this study was to determine the prevalence of BoHV-1 in animals and herds and to identify the risk factors for the infection in breeding cattle herds in the Parana State. In this study, the state was divided into seven regions. The statistic delineation, the serum samples and information regarding the selected farms, were the same employed in the study of bovine brucellosis for Parana State in the context of National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis. The sampling was performed in two stages. Blood samples were collected from 14,803 females aged  $\geq 24$  months from 2018 nonvaccinated herds. Serum samples were tested for antibodies against BoHV-1 using an indirect ELISA. In all the selected farms was applied the epidemiological questionnaire regarding to herd features and also husbandry practices that could be associated with risk of infection. The prevalence of infected herds and animal in Paraná State were 71.30% [69.29-73.32%] and 59.02% [56.19-61.85%], respectively. In the regions, herds and animal seroprevalence were, respectively: region 1: 94.06% [90.65-96.50%] and 71.13% [66.43-75.83%]; region 2: 91.90% [88.10-94.80%] and 66.17% [59.71-72.63%]; region 3:

83.22% [78.43-87.32%] and 60.16% [55.37-64.95%]; region 4: 50.51% [44.65-56.35%] e 45.85% [37.47-54.23%]; region 5: 64.41% [58.65-69.87%] and 49.96 [40.22-59.71%]; region 6: 57.24% [51.32-63.01%] and 54.64% [47.02-62.27%]; region 7: 73.55% [67.93-78.66%] and 54.91% [46.95-62.86]. The risk factors associated with the presence of the infection were: herds of beef cattle (OR=1.58 [1.12-2.23]), natural service (OR=1.48 [1.02-2.14]), purchase animals (OR=1.90 [1.52-2.37]), pasture rental practice (OR=2.24 [1.51-3.33]), existence of calving pens (OR=1.56 [1.20-2.03]) and history of abortion in the last 12 months (OR=1,45 [1.08-1.95]). These results indicate that BoHV-1 infection is widespread in the Parana State and that factors related to the herd characteristic and management are associated with the infection.

**Index terms:** Prevalence, epidemiology, risk factors, bovine herpesvirus 1, indirect ELISA

## RESUMO

A prevalência e distribuição regional da infecção pelo herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) no estado do Paraná não estão bem caracterizadas. Este trabalho teve o objetivo de determinar a prevalência de animais e propriedades e os fatores de risco associados à infecção pelo BoHV-1 no estado do Paraná. Neste estudo o estado foi estratificado em sete circuitos produtores. O delineamento estatístico, amostras de soro e as informações referentes às propriedades foram as empregadas para o estudo da brucelose bovina no Estado do Paraná dentro do contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Foram avaliadas 14.083 fêmeas, provenientes de 2018 rebanhos não vacinados contra o BoHV-1. Para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BoHV-1, foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Em cada propriedade foi aplicado um questionário epidemiológico, a fim de obter informações sobre tipologia e práticas de manejo empregadas. A prevalência de propriedades e animais no estado foi de 71,30% [69,29-73,32%] e 59,02%

[56,19-61,85%], respectivamente. Nos circuitos produtores, a prevalência de focos e animais foram respectivamente: circuito 1: 94,06% [90,65-96,50%] e 71,13% [66,43-75,83%]; circuito 2: 91,90% [88,10-94,80%] e 66,17% [59,71-72,63%]; circuito 3: 83,22% [78,43-87,32%] e 60,16% [55,37-64,95%]; circuito 4: 50,51% [44,65-56,35%] e 45,85% [37,47-54,23%]; circuito 5: 64,41% [58,65-69,87%] e 49,96 [40,22-59,71%]; circuito 6: 57,24% [51,32-63,01%] e 54,64% [47,02-62,27%]; circuito 7: 73,55% [67,93-78,66%] e 54,91% [46,95-62,86%]. Os fatores de risco associados à infecção pelo BoHV-1 foram: i) exploração de corte (OR=1,58 [1,12-2,23]); ii) compra de reprodutores (OR=1,90 [1,52-2,37]); iii) monta natural (OR=1,48 [1,02-2,14]); iv) aluguel de pasto (OR=2,24 [1,51-3,33]); v) presença de piquete de parição (OR=1,56 [1,20-2,03]); vi) histórico de aborto nos últimos 12 meses (OR=1,45 [1,08-1,95]). Estes resultados indicam que a infecção pelo BoHV-1 está amplamente distribuída no estado do Paraná e que fatores relacionados às características das propriedades e ao manejo estão associados à infecção.

**Palavras-chave:** Prevalência, epidemiologia, fator de risco, herpesvírus bovino 1, ELISA indireto.

## INTRODUÇÃO

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), agente etiológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), é um dos principais patógenos de bovinos e responsável por consideráveis perdas econômicas em rebanhos de corte e de leite em todo o mundo (Smith et al. 1995, Van Oirschot 1998).

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e é subdividido nos subtipos BoHV-1.1, isolados de problemas respiratórios, reprodutivos e conjuntivites, e BoHV-1.2, mais frequentemente isolados em infecções genitais (vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa-IPV/BPV) (Metzler et al. 1985, Magyar et al. 1993). A doença em bovinos se caracteriza por uma variedade de sinais clínicos incluindo problemas respiratórios superiores (rinotraqueíte), febre, conjuntivite, redução na produção leiteira, abortamento e lesões da mucosa do trato genital.

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* estabelecem infecção latente em gânglios sensoriais, podendo ser periodicamente reativado sob condições de estresse ou tratamentos com corticóides (Ackermann 1982). O vírus em latência não é detectado por procedimentos virológicos convencionais e o animal pode apresentar subseqüentes e intermitentes episódios de excreção viral, não acompanhados de sinais clínicos, resultando na disseminação e perpetuação da infecção nos rebanhos (Pastoret et al. 1982).

O BoHV-1 apresenta ampla distribuição (Kahrs 1977, Gustafson 1981, Porterfield 1989, Weiblen et al. 1992) e alta freqüência em rebanhos bovinos de todo o mundo (Mickelsen & Evermann 1994). Na Europa, alguns países caracterizados por pequenos rebanhos e baixa prevalência da infecção obtiveram a condição de livres com a implantação de programas de erradicação. Na América do Sul, estudos envolvendo a epidemiologia do

BoHV-1 têm demonstrado freqüência de animais sororreagentes variando entre 13 a 68% (Roche et al. 1998).

No Brasil, a doença foi primeiramente detectada em 1963 em um levantamento sorológico no estado da Bahia e, posteriormente, estudos sorológicos e etiológicos revelaram a presença e alta freqüência da enfermidade em rebanhos de grande parte do país. Mueller et al. (1981) detectaram 42,2% de animais reagentes no estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul foram descritas freqüências de soropositividade de 81,7% (Ravazzolo et al. 1989), 31,9% (Vidor et al. 1995) e 18,8% (Lovato et al. 1995). Takiuchi et al. (2001) verificaram freqüência de animais soropositivos para o BoHV-1 variando entre 52,4 a 81,7%, em rebanhos não vacinados, provenientes dos estados de São Paulo, Paraná, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.

No estado do Paraná, estudos envolvendo a epidemiologia do BoHV-1 foram realizados em propriedades com histórico de problemas reprodutivos e demonstraram freqüências de animais sororreagentes entre 19,7 e 52,4% (Médici et al. 2000, Takiuchi et al. 2001).

Programas de controle do BoHV-1 preconizam a utilização de estratégias que incluem ou não a vacinação dos animais, tendo como objetivos o controle e/ou erradicação da enfermidade. Na Europa, alguns países conseguiram obter *status* de livre da doença, ou sob rígido controle, por meio da implementação de programas de erradicação que incluíam vacinas com marcadores genéticos, associados à realização de testes sorológicos e descarte de animais portadores do vírus (Ackermann et al. 2006). Países como Estados Unidos e Canadá, caracterizam-se pela alta prevalência da infecção pelo BoHV-1 e estratégias de vacinação com estirpes vivas ou inativadas foram adotadas para o controle dos sinais clínicos da doença.

Estudos envolvendo a soroepidemiologia do BoHV-1 no Brasil têm sido realizados e verifica-se alta freqüência de rebanhos e de animais sororreagentes. Medidas de

controle têm sido adotadas por iniciativa voluntária dos pecuaristas e fundamentam-se, principalmente, na utilização de vacinas disponíveis no mercado nacional. Entretanto faltam diretrizes propostas pelo serviço oficial de sanidade animal a fim de contribuir para o efetivo controle da infecção.

Os estudos envolvendo a soroprevalência do BoHV-1 realizados no estado do Paraná restringiram-se a propriedades com histórico de problemas reprodutivos e se caracterizaram pela ausência de delineamento amostral, não sendo possível estabelecer o real impacto e frequência da infecção. Para elucidar a situação epidemiológica da infecção pelo BoHV-1 nas diferentes regiões geográficas do estado do Paraná é necessário o delineamento de estudos mais abrangentes. Os resultados poderão contribuir com a seleção das melhores estratégias de controle e profilaxia, uma vez que as alternativas disponíveis poderão diferir na dependência da frequência e do padrão de distribuição da infecção nas subpopulações estudadas.

Este estudo teve o objetivo de determinar a prevalência de focos e de animais sororreagentes ao BoHV-1 no estado do Paraná e identificar os fatores de risco potencialmente associados com a infecção.

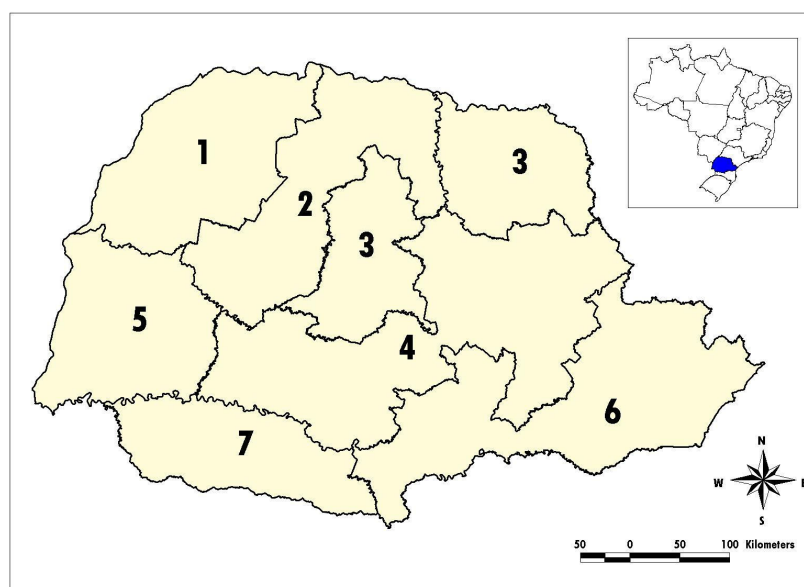
## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População estudada**

O estudo transversal foi realizado no estado do Paraná, localizado no Sul do Brasil, com uma área geográfica de 199.282 Km<sup>2</sup>, com 10.153.375 bovinos (IBGE 2007) distribuídos em 215.392 propriedades (Comunicação pessoal 2007\*). O delineamento amostral utilizado neste trabalho foi o empregado para o estudo da brucelose bovina no estado

do Paraná dentro do contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).

Para o estabelecimento das diferenças regionais nos parâmetros epidemiológicos, o estado foi dividido em sete circuitos produtores de bovinos. Foram considerados os diferentes sistemas de produção, práticas de manejo, finalidades de exploração, tamanho médio de rebanhos e sistemas de comercialização. Cada circuito estava integrado a diferentes núcleos regionais de administração da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB-PR) (Fig. 1). Os dados censitários tomados como base para os cálculos da amostra e das prevalências foram os mais atualizados disponíveis à época do trabalho de campo (Paraná, 2001). O Quadro 1 apresenta o resumo dos dados censitários e também a amostra estudada em cada um dos circuitos produtores.



**Figura 1** – Mapa do Estado do Paraná demonstrando a divisão em circuitos produtores.

Detalhe destacando a localização do Estado do Paraná no Brasil

**Quadro 1** –Dados censitários da população bovina do estado do Paraná em 2001, segundo os circuitos produtores (Paraná, 2001).

Nº	Circuitos produtores		Total de propriedades com atividade reprodutiva	Propriedades analisadas	Total de fêmeas com idade ≥ 24 meses	Fêmeas analisadas
	Região	Núcleos regionais				
1	Noroeste	Umuarama e Paranavaí	23.104	286	1.140.410	2630
2	Centro-Oeste/Norte	Campo Mourão, Maringá e Londrina	20.835	284	750.002	2467
3	Norte Pioneiro	Cornélio Procópio, Ivaiporã e Jacarezinho	27.403	292	972.554	2219
4	Centro-Sul	Laranjeiras do Sul, Guarapuava e Ponta Grossa	42.738	295	878.916	1924
5	Oeste	Cascavel e Toledo	33.451	295	616.012	1930
6	Leste/Sul	Curitiba, União da Vitória, Paranaguá e Irati	18.616	290	173.396	1266
7	Sudoeste	Francisco Beltrão e Pato Branco	44.126	276	517.315	1647
<b>Total</b>			<b>210.273</b>	<b>2.018*</b>	<b>5.048.605</b>	<b>14.083*</b>

\* Foram incluídas no estudo apenas as propriedades que não vacinavam contra o BoHV-1.

### **Delineamento amostral**

O delineamento amostral foi elaborado pelo Departamento de Defesa Animal – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em colaboração com o Setor de Epidemiologia da SEAB-PR. Para estimar a prevalência de focos foi realizado um estudo amostral em dois estágios. Primeiro uma seleção aleatória de um número pré-estabelecido de propriedades, que representam as unidades primárias de amostragem. Dentro das unidades primárias, foi amostrado de forma aleatória um número pré-estabelecido de fêmeas bovinas com idade  $\geq 24$  meses (unidades secundárias), com a finalidade de determinar o estado sanitário do rebanho.

O número de propriedades selecionadas por circuito foi estimado pela fórmula para amostras simples aleatórias proposta por Thrusfield (1995). Os parâmetros adotados para o cálculo foram: nível de confiança de 0,95, prevalência estimada em 50% e erro padrão de 0,06. A capacidade operacional e financeira do serviço veterinário do Estado também foi considerada para a determinação do tamanho da amostra no circuito.

O planejamento amostral para as unidades secundárias visou estimar o número mínimo de animais a serem examinados, dentro de cada propriedade, de forma a permitir a sua classificação como foco ou não foco de BoHV-1. Foram amostradas apenas fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses.

Para efeito dos cálculos foram adotados os valores de 98% e 93%, respectivamente, para a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico utilizado (Dias et al. 2008) e 50% para a prevalência intra-rebanho. Nesse processo foi utilizado o programa Herdacc<sup>®</sup>, *version 3* (University of Guelph) e o tamanho da amostra escolhido foi aquele que permitiu valores de sensibilidade e especificidade superiores a 90%. Assim, em rebanhos constituídos por até 99 fêmeas, com idade igual ou superior a 24 meses, foram amostrados 10 animais e naqueles constituídos por mais de 99 fêmeas, foram amostradas 15 fêmeas (Paraná 2001). A seleção dos animais dentro da propriedade foi casual simples ou sistemática.

Foram testadas um total de 14.083 fêmeas com idade  $\geq 24$  meses, provenientes de 2018 rebanhos não vacinados contra o BoHV-1.

#### **Colheita da amostras de sangue e dados epidemiológicos.**

Os trabalhos a campo consistiram na colheita de sangue e preenchimento de um questionário epidemiológico. A colheita de sangue foi realizada por médicos veterinários e técnicos da SEAB-PR, no período de dezembro de 2001 a julho de 2002, por meio de punção da veia jugular utilizando agulha descartável estéril e tubo com vácuo, previamente identificado. As amostras de soro obtidas foram armazenadas em microtubos de plástico e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O questionário epidemiológico foi aplicado em todas as propriedades selecionadas e teve por objetivo obter informações de sistemas de produção e de manejo.

### Teste sorológico para o BoHV-1.

Para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BoHV-1 foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto.

Células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) foram utilizadas para a produção do antígeno (BoHV-1). As células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM, Invitrogen, EUA), suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB –Invitrogen, EUA) livre de micoplasmas e vírus, 55 mg/mL de gentamicina (Sigma® Co., EUA), 2,5 mg/mL de anfotericina B (Sigma® Co., EUA) e monitoradas pela técnica da RT-PCR quanto à ausência do vírus da diarréia viral bovina, de acordo com Pilz et al. (2007).

Para a produção do BoHV-1 foi utilizada a estirpe *Los Angeles* (LA; Madin et al. 1956) amplificada em cultivo celular em meio DMEM suplementado com 1% SFB. O título viral da suspensão foi calculado em dose infecciosa 50% para cultura de tecidos (50% *tissue culture infective doses* –TCID<sub>50</sub>). Para a produção do antígeno do BoHV-1 foi utilizada a metodologia descrita por Ferreira et al. (2005).

O método de ELISA indireto foi realizado segundo Ferreira et al. (2005) com modificações descritas por Dias et al. (2008).

Para minimizar as variações dos resultados obtidos em cada microplaca, a densidade óptica (DO) de cada soro foi expressa como valor de R (Relação). A determinação do valor de R foi calculada com base nas DOs de 10 soros controles positivos e 10 soros controle negativos, segundo Biondi et al. (1996). Foi obtido nos soros negativos o maior valor de R de 0,102. O ponto de corte foi definido em 0,230, considerando o maior valor de R acrescido de três desvios-padrão.

A sensibilidade e especificidade determinada para o ELISA indireto foi respectivamente, 98% e 93% (Dias et al. 2008) e valor de kappa de 0,954.

### **Análise de dados.**

As informações dos questionários, assim como o resultado da sorologia e a condição da propriedade, foram armazenados num banco de dados utilizando o programa Microsoft Access®. A propriedade foi considerada positiva (foco) para a presença do BoHV-1 se apresentasse pelo menos um animal positivo em propriedades com até sete fêmeas; dois animais em rebanhos de 8 a 99 fêmeas e três animais em propriedades com mais de 99 fêmeas. Estes critérios foram estabelecidos utilizando o programa Herdacc®, *version 3* (University of Guelph) considerando o tamanho da população, prevalência intra-rebanho de 50%, sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico utilizado (ELISA indireto), de forma a obter sensibilidade e especificidade de rebanho superiores a 90%.

### **Cálculo das prevalências**

O planejamento amostral permitiu determinar as prevalências de focos e de fêmeas adultas ( $\geq 24$  meses) soropositivas para o BoHV-1 no estado do Paraná e também em cada um dos circuitos produtores. Os cálculos das prevalências aparentes ponderadas e os respectivos intervalos de confiança foram realizados com o auxílio do programa EpiInfo 6.04d (Dean et al. 1994).

Considerando-se que a amostra de unidades primárias, em cada circuito produtor, foi aleatória sistemática (Cochran 1977), a prevalência aparente de focos do BoHV-1 foi calculada utilizando-se como parâmetros o número de focos e o número de propriedades amostradas (Dean et al. 1994). Para o total do estado, devido à divisão em circuitos produtores, considerou-se que a amostra de unidades primárias foi estratificada sistemática aleatória (Cochran 1977). Os parâmetros utilizados no cálculo da prevalência aparente de focos foram o *status* da propriedade (foco ou livre do BoHV-1), o circuito a que pertence cada propriedade e o peso ponderado de cada propriedade amostrada no circuito, calculado pela

razão entre o número de propriedades com atividade reprodutiva e o número de propriedades amostradas em cada circuito produtor (Dean et al. 1994).

A prevalência aparente de fêmeas maiores que 24 meses soropositivas também foi calculada para cada um dos circuitos produtores e para o estado. Neste caso, a escolha de unidades secundárias foi feita por meio de uma amostra de agrupamentos estratificada por circuito produtor (Cochran 1977). Os parâmetros utilizados neste cálculo foram o *status* do animal (positivo ou negativo); o circuito ao qual pertence a propriedade da qual foi retirada cada amostra; a identificação da propriedade no estudo; e o peso ponderado de cada animal amostrado, calculado pela fórmula (Dean et al. 1994):

$$peso = \frac{\textit{fêmeas} > 24 \textit{ meses no circuito produtor}}{\textit{fêmeas} > 24 \textit{ meses nas propr. amostradas}} * \frac{\textit{fêmeas} > 24 \textit{ meses na propr.}}{\textit{fêmeas} > 24 \textit{ meses amostradas na propr.}}$$

O primeiro fator desta fórmula representa quanto cada animal selecionado representa no circuito, e o segundo quanto cada animal representa na propriedade.

### **Estudo dos fatores de risco**

Para os dados consolidados para o estado foi realizado um estudo de fatores de risco do tipo transversal. Foram formados dois grupos de propriedades (focos e não focos) que, quando comparados entre si quanto às variáveis pesquisadas no questionário epidemiológico, permitiu medir a força da associação dessas variáveis com a presença do BoHV-1. As variáveis analisadas foram: tipo de exploração (ou sistema de produção: carne, leite e misto); tipo de criação (confinado, semiconfinado, extensivo); uso de inseminação artificial; raças predominantes; número de vacas com idade superior a 24 meses; número de bovinos na propriedade; presença de animais silvestres; destino da placenta e de fetos abortados; compra e venda de animais; histórico de abortamento nos últimos 12 meses; abate de animais na propriedade; aluguel de pastos; pastagens em comum com outras propriedades; piquete de parição e assistência veterinária.

As categorias das variáveis foram organizadas de modo a apresentarem-se em escala crescente de risco, segundo informações da literatura (Kahrs 1977, Wyler et al. 1989, Wentink et al. 1993, Van Schaik et al. 1998, Van Schaik et al. 2002). Quando necessário, realizou-se a recategorização dessas variáveis. A categoria de menor risco foi considerada como base para a comparação das demais categorias. As variáveis quantitativas foram recategorizadas em quartis.

A análise univariada foi realizada para verificar a associação entre o *status* do rebanho para o BoHV-1 (ausência de animais positivos = **0**; presença de um, dois ou três animais soropositivos, de acordo com os critérios descritos anteriormente = **1**) e variáveis de risco, utilizando o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher. As variáveis com valor de  $p < 0,2$  na análise univariada foram incluídas na análise de regressão logística multivariada (Hosmer & Lemeshow 1989). As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS *version* 9.0 (SPSS INC. 1999a).

## **RESULTADOS**

### **Caracterização da população amostrada**

No estado do Paraná, o número de bovinos nas propriedades variou entre 1 e 3527, apresentando mediana de 19,0 animais (primeiro quartil = 9,0; terceiro quartil = 51,0). Os valores correspondentes aos circuitos produtores de acordo com o sistema de exploração zootécnica estão apresentados no diagrama de blocos da Figura 2.

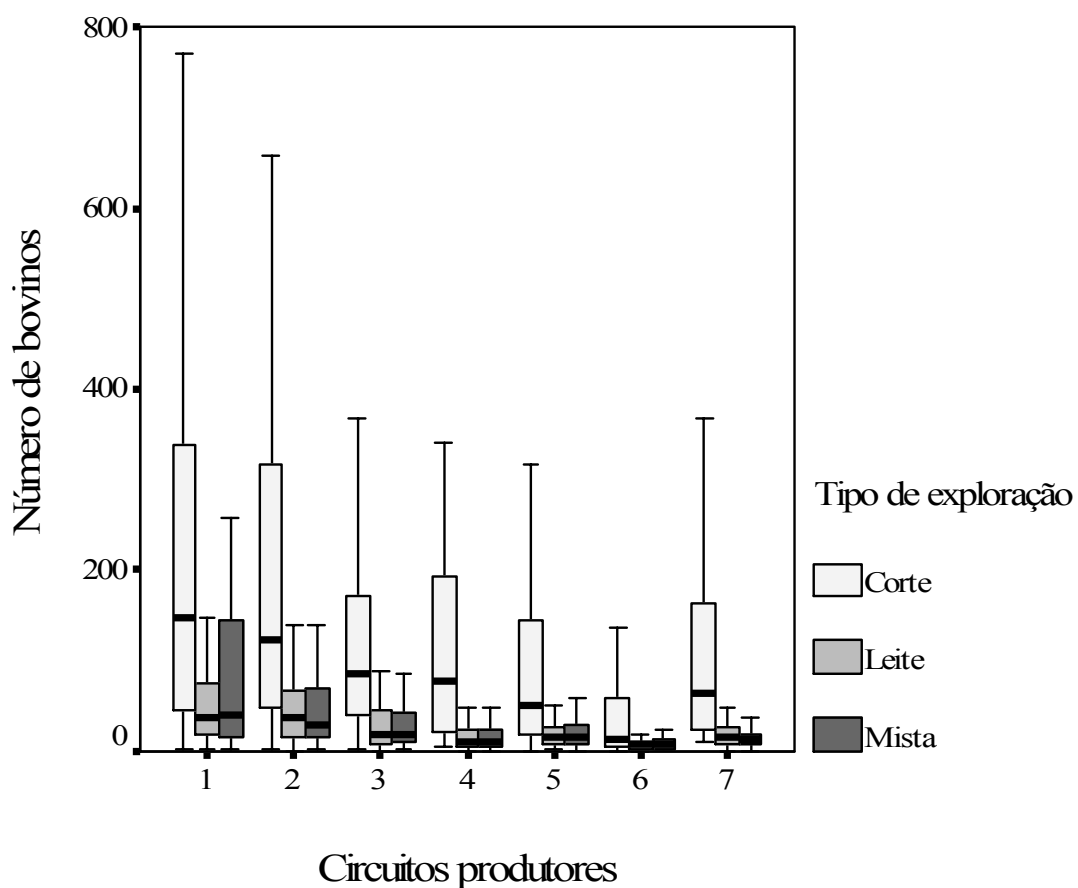


Figura 2 – Diagrama de blocos mostrando a dispersão do tamanho dos rebanhos bovinos de acordo com o sistema de exploração zotécnica nos circuitos produtores do estado do Paraná.

### Prevalência

Dos 2018 rebanhos analisados, 1481 (71,30%;IC:69,29-73,32) foram considerados positivos. No Quadro 2 está demonstrado o resultado da prevalência de focos do BoHV-1 nos circuitos produtores e no estado do Paraná. A prevalência de focos estratificada por tipo de exploração está apresentada no Quadro 3.

**Quadro 2** –Prevalência de focos do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) nos circuitos produtores e estado do Paraná.

Circuito Produtor	Propriedades		Prevalência (%)	IC 95%
	Avaliadas	Positivas		
1	286	269	94,06	[90,65-96,50]
2	284	261	91,90	[88,10-94,80]
3	292	243	83,22	[78,43-87,32]
4	295	149	50,51	[44,65-56,35]
5	295	190	64,41	[58,65-69,87]
6	290	166	57,24	[51,32-63,01]
7	276	203	73,55	[67,93-78,66]
<b>Total</b>	<b>2.018</b>	<b>1.481</b>	<b>71,30</b>	<b>[69,29-73,32]</b>

Efeito do desenho amostral = 1,04

**Quadro 3** –Prevalência de focos do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) estratificada por tipo de exploração (corte, leite e misto), nos circuitos produtores e estado do Paraná.

Circuito produtor	Prevalência de focos do BoHV-1					
	Corte		Leite		Misto	
	%	IC (95%) (%)	%	IC (95%) (%)	%	IC (95%) (%)
1	93,67	[85,84-97,91]	98,96	[94,33-99,97]	90,09	[82,96-94,95]
2	98,46	[91,72-99,96]	89,73	[83,62-94,13]	91,67	[82,74-96,88]
3	83,93	[71,67-92,38]	74,00	[64,27-82,26]	89,71	[83,33-94,26]
4	58,82	[46,23-70,63]	47,22	[37,54-57,06]	47,86	[38,54-57,29]
5	88,00	[68,78-97,45]	62,50	[54,51-70,02]	61,47	[51,66-70,63]
6	71,79	[55,13-85,00]	50,98	[40,89-61,01]	58,90	[50,47-66,97]
7	93,75	[69,77-99,84]	77,36	[68,21-84,92]	68,83	[60,88-76,04]
<b>Total</b>	<b>83,33</b>	<b>[78,99-87,09]</b>	<b>71,52</b>	<b>[68,29-74,59]</b>	<b>71,36</b>	<b>[68,18-74,39]</b>

A prevalência de animais que apresentaram anticorpos contra o BoHV-1 está demonstrada no Quadro 4. Dos 14.083 animais avaliados no estado, 7.125 foram sororreagentes, apresentando prevalência de 59,02% [IC: 56,19-61,85%].

**Quadro 4** – Prevalência de animais sororreagentes ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) nos circuitos produtores e estado do Paraná.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	IC 95%
	Testados	Positivos		
<b>1</b>	2630	1686	71,13	[66,43-75,83]
<b>2</b>	2467	1564	66,17	[59,71-72,63]
<b>3</b>	2219	1223	60,16	[55,37-64,95]
<b>4</b>	1924	633	45,85	[37,47-54,23]
<b>5</b>	1930	727	49,96	[40,22-59,71]
<b>6</b>	1266	545	54,64	[47,02-62,27]
<b>7</b>	1647	747	54,91	[46,95-62,86]
<b>Total</b>	<b>14.083</b>	<b>7.125</b>	<b>59,02</b>	<b>[56,19-61,85]</b>

No Quadro 5 apresenta o resultado da análise univariada dos possíveis fatores de risco para o BoHV-1 no estado do Paraná. As variáveis com valor de  $p < 0,2$  foram incluídas na análise de regressão logística multivariada. O modelo final de regressão logística multivariada está apresentado no Quadro 6.

**Quadro 5** – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos bovinos do estado do Paraná.

Variável	Categorias	Casos/Expostos	Frequência (%)
<b>Tipo de criação</b>	1: extensivo <sup>b</sup>	1159/1591	<b>72,8</b>
	2: semi-confinado / confinado	312/414	<b>75,4</b>
<b>Tipo de exploração <sup>c</sup></b>	1: leite <sup>b</sup>	585/818	<b>71,5</b>
	2: corte	290/348	<b>83,3</b>
	3: mista	603/845	<b>71,4</b>
<b>Raça predominante</b>	1: puras	496/664	<b>74,7</b>
	2: outras	940/1290	<b>72,9</b>
<b>Nº de fêmeas bovinas <sup>c</sup></b>	0: < 23 fêmeas <sup>b</sup>	1032/1534	<b>67,3</b>
	1: ≥ 23 fêmeas	449/484	<b>92,8</b>
<b>Nº de fêmeas ≥ 24 meses <sup>c</sup></b>	0: < 13 fêmeas <sup>b</sup>	1002/1500	<b>66,8</b>
	1: ≥ 13 fêmeas	479/518	<b>92,5</b>
<b>Presença de animais silvestres</b>	0: não <sup>b</sup>	1075/1455	<b>73,4</b>
	1: sim	406/563	<b>72,1</b>
<b>Uso da inseminação artificial (IA) <sup>c</sup></b>	1: só I.A. <sup>b</sup>	105/163	<b>64,4</b>
	2: I.A. / monta natural	153/221	<b>69,2</b>
	3: só monta natural	1189/1584	<b>75,1</b>
<b>Compra animais para reprodução <sup>c</sup></b>	0: não <sup>b</sup>	708/1064	<b>66,5</b>
	1: sim	763/936	<b>81,5</b>
<b>Vende animais para reprodução <sup>c</sup></b>	0: não <sup>b</sup>	1095/1553	<b>70,5</b>
	1: sim	372/439	<b>84,7</b>
<b>Destino do aborto</b>	0: enterra/joga/queima <sup>b</sup>	564/723	<b>78,0</b>
	1: deixa abortos na pastagem	515/661	<b>77,9</b>
<b>Aluguel pasto <sup>c</sup></b>	0: não <sup>b</sup>	1239/1739	<b>71,2</b>
	1: sim	232/266	<b>87,2</b>
<b>Pasto comum <sup>c</sup></b>	0: não <sup>b</sup>	1269/1742	<b>72,8</b>
	1: sim	204/263	<b>77,6</b>
<b>Piquetes de parição <sup>c</sup></b>	0: não <sup>b</sup>	1027/1450	<b>70,8</b>
	1: sim	427/529	<b>80,7</b>
<b>Assistência veterinária</b>	0: sim <sup>b</sup>	433/571	<b>75,8</b>
	1: não	1017/1400	<b>72,6</b>
<b>Histórico de aborto <sup>c</sup></b>	0: não <sup>b</sup>	1156/1605	<b>72,0</b>
	1: sim	299/370	<b>80,8</b>

<sup>a</sup> Algumas perguntas não foram respondidas pelos proprietários

<sup>b</sup> Categoria baseline

<sup>c</sup>  $p < 0,20$  na análise univariada e incluídas no modelo de regressão logística multivariada

**Quadro 6** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em rebanhos com atividade reprodutiva do estado do Paraná.

<b>Variáveis</b>	<b>Casos</b>	<b>Expostos</b>	<b>p</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>IC 95%</b>
Exploração- Corte	290	348	0,009	1,58	[1,12-2,23]
Compra reprodutores	763	936	0,000	1,90	[1,52-2,37]
Monta natural	1189	1584	0,038	1,48	[1,02-2,14]
Aluguel de pasto	232	266	0,000	2,24	[1,51-3,33]
Presença de piquete de parição	427	529	0,001	1,56	[1,20-2,03]
Histórico de aborto	299	370	0,014	1,45	[1,08-1,95]

$R^2 = 8,7\%$

## DISCUSSÃO

No estado do Paraná, o número de bovinos nas propriedades variou entre 1 e 3527, apresentando mediana de 19,0 animais. Os circuitos produtores 1 (região noroeste) e 2 (região centro-oeste/norte) representam 40,8% do total de bovinos do estado e apresentaram os maiores rebanhos na amostra.

O circuito produtor 1 (região noroeste) apresentou os maiores rebanhos do estado e as propriedades de corte apresentaram mediana do número de bovinos de 148,50 e representaram 59,55% do total de animais amostrados no circuito. Esta região se caracteriza pela bovinocultura de corte mais tecnicada do estado, com áreas de pastagens artificiais destinadas ao confinamento e terminação de animais precoces.

O circuito 6 (região leste/sul) apresentou os menores rebanhos da amostra (mediana de 8), caracterizando-se por pequenas propriedades de exploração predominantemente mista.

Considerando o período e as propriedades estudadas, a produtividade de leite foi maior no circuito 6 (região centro-oeste/norte) com uma média de produção diária de leite de

12,24 L/vaca. Entretanto, dados do IBGE referente à produção leiteira no estado em 2006, demonstram uma maior produção nos circuitos produtores 5 (região oeste) e 7 (região sudoeste), que somados representam 49% da produção leiteira do estado. Nessas regiões predomina a agricultura familiar em que a venda de leite é a fonte principal da renda mensal. A região centro sul (circuito produtor 4), se caracteriza por um sistema extensivo de ciclo completo entretanto existe na região de Ponta Grossa uma bacia leiteira altamente tecnificada com a maior produtividade por animal do Estado. Nesta região se encontra o município de Castro, que mais produziu leite no país em 2006 e que se caracteriza por alta tecnologia de produção, genética apurada e produtividade semelhante à obtida em rebanhos europeus.

Para o estado do Paraná, verificou-se a prevalência de focos do BoHV-1 de 71,30% [69,29-73,32%] (Quadro 2). Estudos anteriores realizados no estado, envolvendo a soropidemiologia do BoHV-1, não foram caracterizados por delineamento amostral e apresentaram frequências superiores (Richtzenhain et al. 1999, Médici et al. 2000). Médici et al. (2000) encontraram 92% de rebanhos positivos para o BoHV-1, em um estudo envolvendo propriedades com histórico de problemas reprodutivos provenientes de 30 municípios do estado. Os rebanhos selecionados no presente trabalho não apresentavam histórico de vacinação contra IBR, de forma que o resultado de prevalência de focos (71,30%) representa infecção natural.

O circuito produtor 1, que inclui os núcleos regionais de Umuarama e Paranavaí e circuito produtor 2, núcleos de Campo Mourão, Maringá e Londrina, apresentaram as maiores prevalências pontuais, 94,06% e 91,90% respectivamente. No período estudado, essas regiões concentravam 40% do total de bovinos do estado e apresentaram as maiores medianas do número de bovinos nas propriedades (Figura 2).

O circuito produtor 4, representado pelos núcleos regionais de Laranjeiras do Sul, Guarapuava e Ponta Grossa, apresentou a menor prevalência de focos (50,51%) do estado. As

propriedades leiteiras do circuito 4 se caracterizam por rebanhos menores com mediana do número de bovinos igual a 11 (Figura 2). Essa região envolve uma bacia leiteira altamente tecnificada com a maior produtividade por animal do Estado.

Em propriedades tecnificadas a taxa de renovação dos animais é maior, pois devido ao alto custo da produção, fatores que interferem na redução da produção e aumento dos custos são rapidamente diagnosticados. Desta forma, animais que apresentam baixa produção leiteira, problemas reprodutivos, mastite, problemas de casco, entre outros fatores, são sistematicamente descartados.

Práticas de manejo como a utilização de inseminação artificial e presença do piquete de parição são mais frequentes em propriedades tecnificadas. A utilização de inseminação artificial favorece o controle da disseminação do BoHV-1, considerando o uso de sêmen livre do vírus. A presença do piquete de parição indica grau de tecnificação e possibilita o controle mais efetivo do rebanho, pois é possível a identificação e descarte de animais que não pariram na estação de monta, ou que apresentaram problemas. Entretanto com o manejo mais intensivo pode ocorrer concentração de partos e com a ocorrência de abortos tardios há maior probabilidade de contaminação do ambiente.

Mc Dermott et al. (1997) estudando a variabilidade da prevalência de BoHV-1 em três distritos no Kenya concluíram que as variações de prevalência entre regiões podem ser parcialmente explicadas pela atuação de fatores como tamanho do rebanho, medidas de controle de doenças, tipo de criação e idade dos animais.

A prevalência de focos de BoHV-1 no Estado, estratificada por tipo de exploração, foi maior em rebanhos especializados na pecuária de corte 83,33 [78,99-87,09] (Quadro 3). Nos circuitos produtores, a prevalência pontual de BoHV-1 também foi maior nas propriedades de corte, exceto nos circuitos 1 e 3 (Tabela 3). Estudos realizados em rebanhos de corte com problemas reprodutivos nos Estados do Rio Grande do Sul (Vidor et al. 1995) e

Paraná (Médici et al. 2000), encontraram frequências de rebanhos positivos de 71,3% e 100% respectivamente. Uma característica no manejo deste tipo de exploração pode estar relacionada à menor taxa de reposição das matrizes e menor controle sanitário de doenças da reprodução em relação às propriedades leiteiras.

A prevalência de focos de BoHV-1 em propriedades leiteiras e mistas foi 71,52% [68,29-74,59%] e 71,36% [68,18-74,39%] respectivamente. Médici et al. (2000) analisando rebanhos leiteiros com histórico de problemas reprodutivos do estado do Paraná encontraram frequência de 90,05%. No Rio Grande do Sul, um estudo envolvendo rebanhos provenientes de 9 bacias leiteiras demonstrou uma prevalência de BoHV-1 de 54,5% (Lovato et al. 1995).

A prevalência de animais sororreagentes ao BoHV-1 no Estado foi 59,02% [56,19-61,85]. Estudos realizados no estado do Paraná em bovinos com histórico de problemas reprodutivos apresentaram 43,7% (Médici et al. 2000) e 52,4% (Takiuchi et al. 2001) de animais sororreagentes ao BoHV-1. Considerando que no presente trabalho a amostragem dos animais e propriedades foi aleatória, o aumento da frequência da infecção pelo BoHV-1 no estado pode ser devido à disseminação da infecção nos rebanhos paranaenses por falhas de manejo que podem favorecer o contato de animais susceptíveis com infectados.

As regiões noroeste e centro-oeste/norte apresentaram as maiores prevalências de animais sororreagentes ao BoHV-1, 71,13% e 67,17% respectivamente. Essas regiões concentram a maior população de bovinos do estado e são especializadas na pecuária de corte. Essas regiões fazem divisa com os estados do Mato Grosso do Sul (MS) e São Paulo (SP), possibilitando uma intensa movimentação de animais entre esses estados, principalmente de animais especializados na pecuária de corte, e permitindo uma situação epidemiológica do BoHV-1 nestas regiões, semelhante às encontradas nos estados do MS e SP.

Nos estados do MS e SP foram descritas frequências de 86,08% (371/431) e 68,65% (300/437), respectivamente, de bovinos positivos para o BoHV-1 provenientes de

propriedades localizadas em regiões de maior desenvolvimento pecuário (Richtzhain et al. 1999). Takiuchi et al. (2001) estudaram propriedades com histórico de problemas reprodutivos desses dois estados e encontraram frequências de 69,4% (2.906/4188) de animais sororreagentes ao BoHV-1 para o MS e 53,9% (348/646) para SP.

A análise multivariada dos fatores de risco para a infecção pelo BoHV-1 em rebanhos bovinos do estado do Paraná, demonstrou que propriedades especializadas na pecuária de corte possuem maior probabilidade de serem positivas do que rebanhos leiteiros e mistos (Quadro 6). Os rebanhos de corte amostrados neste trabalho apresentaram as maiores medianas do número de bovinos em relação aos outros tipos de exploração em todas as regiões estudadas (Figura 2). A associação entre o tamanho do rebanho e a soropositividade para o BoHV-1 pode ser atribuída a outras variáveis, fortemente relacionadas com o tamanho do rebanho, como a frequência de compra de animais, participação em eventos agropecuários, visitas profissionais e presença de trabalhadores regulares e temporários nas propriedades (Van Schaik et al. 1998).

A aquisição de animais em período de incubação ou nas fases aguda ou latente da infecção pelo vírus é descrita como principal fator de introdução do BoHV-1 no rebanho (Msolla et al. 1981, Pastoret et al. 1982). No presente trabalho, a compra de animais destinados à reprodução foi considerada fator de risco para o BoHV-1 na análise multivariada (Tabela 6). Van Schaik et al. (1998) estudando os fatores de risco para introdução do BoHV-1 em rebanhos leiteiros da Holanda, demonstraram que propriedades que compravam animais teriam 3,5 vezes mais chances de serem positivas que propriedades fechadas, considerando uma média de compra de 4,5 animais por ano.

Vários autores citam o sêmen como via de eliminação do vírus (Straub 1990, Wentink et al. 1993, Oirschot 1995, Rocha et al. 1999). No presente trabalho, propriedades que utilizavam a monta natural como método de reprodução apresentaram maior

probabilidade de serem positivas do que as que utilizavam a Inseminação artificial (IA) (Quadro 6). Estudos demonstraram que a eliminação do BoHV-1 pelo sêmen pode ser intermitente e que o vírus pode ser isolado de bovinos soronegativos, dificultando a identificação desses animais no rebanho (Huck et al. 1971, Xia et al. 1995, Gee et al. 1996). Nas centrais de IA, embora as condições de armazenamento do sêmen favoreçam a conservação do vírus, normas rigorosas de controle têm sido estabelecidas com o objetivo de garantir a ausência do BoHV-1.

As propriedades que utilizavam piquete de parição apresentaram 1,56 vezes mais chances de serem positivas para o BoHV-1 do que as que não utilizavam (Quadro 6). O piquete de parição é uma excelente prática para facilitar o manejo, assistência ao parto e ao bezerro. Porém, essa prática de manejo zootécnico pode facilitar a transmissão de microrganismos eliminados no peri-parto quando o manejo das instalações é realizado de forma inadequada. Considerando a imunodepressão fisiológica que ocorre nesta fase, animais com infecção latente podem reativar e excretar o vírus e, devido ao maior agrupamento de animais no piquete de parição associado a falhas de manejo, pode predispor a maior probabilidade de infecção.

A utilização de pastagens de outras propriedades pode favorecer introdução de doenças, inclusive da infecção pelo BoHV-1, quando as características de manejo não são adequadas e o *status* sanitário da propriedade a ser utilizada é desconhecido. Neste estudo, propriedades que alugavam pastagens apresentaram 2,24 vezes mais chances de serem positivas do que rebanhos que não praticavam esse manejo.

O abortamento é a manifestação clínica da IBR e de diversas enfermidades. Neste estudo, o histórico de aborto foi associado à positividade de rebanhos ao BoHV-1, demonstrando que o vírus pode ser o agente etiológico e deve ser incluído no diagnóstico diferencial de problemas reprodutivos ocorridos no estado.

A alta prevalência de animais e focos do BoHV-1, no período estudado, demonstra que o vírus está amplamente distribuído em todas as regiões do estado, principalmente nos rebanhos de corte. O resultado da análise dos fatores de risco indica que a característica das propriedades e fatores relacionados ao manejo estão associados à soropositividade para o BoHV-1 e devem ser considerados em programas de prevenção da doença.

Experiências de programas de controle em países europeus que apresentavam baixas frequências de BoHV-1, demonstram a viabilidade da utilização de vacinas com marcador genético, estratégia que permite a diferenciação de animais infectados e vacinados, e descarte de animais positivos. Países como Estados Unidos e Canadá, caracterizados pela alta prevalência do BoHV-1, estabeleceram programas de controle baseados na utilização tanto de vacinas vivas quanto inativadas, que se caracterizam por impedir a manifestação clínica, porém podem não contribuir para a redução da prevalência do vírus (Ackermann et al. 2006).

Atualmente no Brasil, vacinas com marcadores genéticos não estão disponíveis no mercado e as medidas de controle da infecção adotadas são de iniciativa voluntária baseada na utilização ou não de vacinas, tendo por objetivo controle e/ou erradicação da IBR.

As vacinas contra o BoHV-1 apresentam boa eficácia na prevenção de sinais clínicos e da re-excreção viral, entretanto não são capazes de impedir a infecção. Desta forma, práticas de manejo adequadas associadas à imunoprofilaxia são elementos importantes no controle da introdução e manutenção do vírus no rebanho. Dentre as medidas a serem adotadas destacam-se a realização de testes sorológicos antes da introdução de animais na propriedade e medidas rígidas de quarentena. O contato indireto entre propriedades deve ser evitado e a utilização de piquetes de parição deve envolver práticas de manejo adequadas de forma que não atuem como disseminadores de doenças.

Considerando a alta prevalência do BoHV-1 no estado do Paraná e nos circuitos produtores, se torna inviável no momento uma política oficial de controle e erradicação da doença. A importância da IBR para a economia pecuária, e as exigências referentes ao comércio internacional de animais e produtos de biotecnologia com relação ao BoHV-1, poderá levar a um programa de controle direcionado a rebanhos que exportem material genético, animais de centrais de IA e matrizes doadoras de embriões.

Os resultados obtidos neste trabalho poderão orientar os profissionais quanto às medidas de controle adotadas, fundamentada na análise dos fatores de risco associados à infecção no estado. A seleção da melhor estratégia de controle envolverá a situação epidemiológica da área em questão. A utilização de práticas de manejo com o objetivo de restringir a introdução do BoHV-1 são fundamentais e podem ser aplicadas nas diferentes situações. A vacinação em áreas de alta prevalência é recomendada na prevenção dos sinais clínicos, sendo utilizada com sucesso em programas de controle. Em áreas de baixa prevalência deve se considerar economicamente a erradicação do vírus da propriedade, com descarte de animais positivos.

**Agradecimentos.-** Os autores agradecem à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB-PR) e Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo auxílio no delineamento amostral, colheita de amostras, dados epidemiológicos e elaboração do questionário, e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS-USP) pelo auxílio na elaboração do questionário epidemiológico e análise dos dados. Este trabalho teve o suporte financeiro concedido pela CAPES, CNPq, FINEP e Fundação Araucária (FAP/PR).

## REFERÊNCIAS

Ackermann M., Peterhans E. & Wyler R. 1982. DNA of bovine herpesvirus 1 in trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 4:36-40.

Ackermann M. & Engels M. 2006. Pro and contra IBR-eradication: *Vet. Microbiol.* 113:293-302.

Barbosa A.C.V.C., Brito W.M.E.D. & Alfaia B.T. 2005. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Cienc. Rural.* 35(6):1368-1373.

Biondi G.F., Mucciolo R.G., Nunes C.M. & Richtzenhain L.J. 1996. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect Elisa employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. *Vet. Parasitol.* 64:261-266.

Bowen R.A., Elsdon R.P. & Seidel S.E. 1985. Herpesvirus bovine type 1-abortion. *Am. J. Vet. Res.* 46:1095-1097.

Bitsch V. 1978. The modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta Vet. Scan.* 19:497-505.

Cochran W.G. 1997. *Sampling techniques*. 3<sup>a</sup>.ed. New York: John Wiley & Sons. 428p.

Coggon T., Rose G. & Barker D.J. 1983. Measurement, error and bias, p.20-25. In: Coggon T., Rose G. & Barker D.J. (ed.) *Epidemiology for the Uninitiated*, 3<sup>a</sup> ed. London: BMJ Publishing Group.

Dean A.G., Dean J.A., Colombier D., Brendel K.A., Smith D.C., Burton A.H., Dicker R.C., Sullivan K., Fagan R.F. & Arner T.G. 1994. Epi-Info, Version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, CDC. 601p.

Dias J.A., Alfieri A.A., Médici K.C., Freitas J.C., Ferreria-Neto J.S. & Muller E.E. 2008. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região oeste do Estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.* 28(3):127-134.

Epiinfo 6.04d. 1994. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention. Disponível em <<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6>>. Acesso em: 10 jul. 2007.

Faria B.O., Freneau G.E., Brito W.M.E.D., Campos Jr. A.C.P. & Vieira S. 2003. Estudo de anticorpos contra o herpes vírus bovino tipo 1 em municípios de entorno de Goiânia, GO. *Vet. Bras. Reprod. Anim.* 27(3):543-545.

Ferreira M.C., Médici K.C., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2005. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino 1. *Semina: Cienc. Agr.* 26(3):363-372.

Gee A.L.W., Watger L.H.A. & Hage J.J. 1996. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.* 53(1):163-168.

Gustafson D. P. 1981. Herpesvirus Disease Of Mammals And Birds: Comparative aspects and diagnosis. In: *Comparative Diagnosis of Viral Disease*. New York: Academic Press.

Herdacc version 3. 1995. Guelph: University of Guelph. Disponível em: <<http://www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/files/herdacc.exe>>. Acesso em: 10 jul. 2007.

Hosmer Jr D.W. & Lemeshow S. 1989. Applied logistic regression. New York: Wiley. 307p.  
Huck R.A., Millar P.G., Evans D.H., Stables J.W & Ross A. 1971. Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. Vet. Rec. 88:292-297.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Bioestatística. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em: 7 maio 2007.

Kahrs R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171(10):1055-1064.

Kirkbride C.A. 1985. Managing and outbreak of livestock abortion - 2: diagnosis and control of bovine abortion. Vet. Med. 80(5):70-79.

Lovato L.T., Weiblein R., Tobias, F.L. & Moraes M.P. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Cienc. Rural. 25(3):425-430.

Madin S.H., Mckercher D.G. & York C.J. 1956. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. Science. 124(3225):721-2.

Magyar G., Tanyi J., Hornyák A. & Bartha A. 1993. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR/IPV and encephalitis. *Acta Vet. Hung.* 4(1/2):159-170.

McDermott J.J., Kadohira M., O'Callaghan C.H. & Shoukri M.M. 1997. A comparison of different models for assessing variations in the sero-prevalence of infectious bovine rhinotracheitis by farm, area and district in Kenya. *Prev. Vet. Med.* 32:219-234.

Médici K.C., Alfieri, A.A. & Alfieri, A.F. 2000. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Cienc. Rural.* 30(2):347-350.

Melo C.B, Lobato Z.I.P., Camargos G.N., Souza N.R.S, Martins & Leite R.C. 2002. Distribuição de anticorpos para herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.* 54(6):575-580.

Metzler A.E., Matile H., Gassmann V., Engels M. & Wyler R. 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 85:57-59.

Mickelsen W.D. & Evermann J.F. 1994. In utero infections responsible for abortions, stillbirth and birth of weak calves in beef cows. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* 10:1-13.

Miller J.M. 1991. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Vet. Med.* 86(1):95-98.

Msolla P.M., Wiseman A. & Selman I.E. 1981. The prevalence of serum neutralized antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland. *J. Hyg.* 86:209-215.

Mueller S.B.K., Ikuno A.A., Machado J.S., Lima R.M.A., Richtzenhain L.J. & Taki E.M. 1981. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. *O Biológico.* 47(2):55-59.

Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M., & Graat E.A.M. 1997. *Application of quantitative methods in veterinary epidemiology.* Wageningen: Wageningen Press. 445p.

Paraná. 2001. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Departamento da Fiscalização. Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal: manual de procedimentos: estudo soropidemiológico da brucelose bovina e bubalina. 21p.

Pastoret P., Thiry E., Brochier B. & Derbover B. 1982. Bovid Herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. *Annual Record Veterinary.* 13:221-235.

Pilz D., Alfieri A.F., Lunardi M. & Alfieri A.A. 2007. RT-PCR em pools de soros sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(1):1-7.

Porterfield J.S. 1989. *Andrews's viruses of vertebrates*. 5 ed. London: Baillière Tindall.

Ravazzolo A.P., Pizzol M.D. & Moojen V. 1989. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos, em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS.* 17:89-95.

Richtzenhain J.J., Barbarini O., Umehara O., De Gracia A.S., Cortez A., Heinemann M.B. & Ferreria F. 1999. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina: Levantamento sorológico nos Estados de Minas Gerais, Mato grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.* 66(1):83-88.

Rocha M.A., Gouveia A.M.G. & Leite R.C. 1999. Herpesvírus bovino 1 no sêmen. *Ciênc. Rural.* 29(2):373-380.

Roehe P. M., Teixeira M. B., Esteves P. A., Melo S. V., Almeida R. S., D'arce R. C. F., Silva T. C., Lemos R. A. & Oliveira L. G. 1998. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: *Simpósio Internacional sobre herpesvírus bovino (tipo 1 e 5) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV)*. Santa Maria. Anais... Santa Maria RS. 89- 96.

Straub O.C. Infectious bovine rhinotracheitis vírus. 1990. In: *Dinter Z. & Morun B. Virus Infectious of Ruminants*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 71-108.

Smith G.A., Young P.L. & Reed K.C. 1995. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Arch. Virol.* 140:599-603.

SPSS INC. 1999a. SPSS base 9.0 user's guide. Chicago. 740p

SPSS.INC. 1999b. SPSS base 9.0 user's guide. Chicago. 1 CD-Rom.

Takiuchi E., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2001. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. *Semina: Cienc. Agr.* 22(2):203-209.

Thrusfield M. 1995. *Veterinary Epidemiology*. 2<sup>a</sup>ed. Cambridge: Blackwell Science. 479p.

Van Oirschot J.T. 1995. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Quart.* 17(1):29-33.

Van Oirschot J.T. 1998. The BHV-1- Situation in Europe. In *Simpósio Internacional sobre herpesvírus bovino (tipo 1 e 5) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV)*. Santa Maria. Anais... Santa Maria, RS. 69-72.

Van Schaik G., Dijkhuizen A.A., Huirne R.B.M., Schukken Y.H., Nielen M. & Hage H.J. 1998. Risk factors for existence of Bovine Herpes Virus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 34:125-136.

Van Schaik G., Nielen M., Dijkhuizen A.A., Barkema H.W. & Benedictus G. 2002. Probability and risk factors for introduction of infectious disease into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Prev. Vet. Med.* 54(3):279-289.

Vidor T., Halfen D.C., Leite T.E. & Coswig L.T. 1995. Herpes bovino tipo 1 (HVB-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Cienc. Rural.* 25(3):421-424.

Weiblen R., Kreutz L. C., Canabarro T. F., Schuch L.F. & Rebelato M.C. 1992. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bull with balanoposthitis. *J Vet Diagn Invest.* 4:(341-343).

Wentink G.H., Van Oirschot J.T. & Verhoeff J. 1993. Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV1): a review. *Vet. Quart.* 15(1):30-33.

Wyler R., Engels M. & Schwyzer M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis / vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittmann G. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs.* Boston: Kluwer Academic Publishers, p.1-72.

Xia J.Q., Lofstedt R.M., Yason C.V. & Kibenge F.S. 1995. Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridization, polymerase chain reaction and virus isolation. *Res Vet Sci.* 59(2):183-185).

## 5 CONCLUSÕES

- O BoHV-1 está amplamente distribuído nos rebanhos paranaenses apresentando altas prevalências de propriedades e animais em todos os circuitos produtores.

- O circuito produtor 1 (núcleos regionais de Umuarama e Paranavaí) e circuito produtor 2 (núcleos de Campo Mourão, Maringá e Londrina) apresentaram as maiores prevalências pontuais e também os maiores rebanhos da amostra.

- O circuito produtor 4 (núcleos regionais de Laranjeiras do Sul, Guarapuava e Ponta Grossa), caracterizado por pequenas propriedades, apresentou a menor prevalência de focos (50,51%) do estado.

- Propriedades de corte apresentaram maior prevalência pontual em todos os circuitos produtores, exceto no circuito produtor 1.

- As variáveis associadas à soropositividade ao BoHV-1 nas propriedades com atividade reprodutiva no Estado do Paraná são: propriedades com exploração de corte (OR= 1,58), a compra de reprodutores (OR=1,90), a utilização da monta natural como método de reprodução (OR= 1,48), a prática de aluguel de pasto (OR= 2,24), utilização de piquete de parição (OR= 1,56) e histórico de abortamento (OR= 1,45).

- Considerando o circuito produtor 5, as variáveis associadas ao BoHV-1 nas propriedades com atividade reprodutiva são: manter 13 ou mais fêmeas acima de 24 meses na propriedade (OR= 2,22), a compra de reprodutores (OR= 2,68), utilizar pasto comum com outras propriedades (OR= 5,93), apresentar histórico de abortamento e a presença de animais silvestres (OR= 8,86).

## APÊNDICE

## APÊNDICE

### 1. Lista de reagentes

#### 1.1. Técnica de Elisa indireto

- Ácido cítrico (H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) PM 192,13 (Reagen®)
- Ácido clorídrico (HCl) PM 36,46 (Reagen®)
- Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) PM 84,01 (Biotec®)
- Carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) PM 105,99 (Reagen®)
- Cloreto de sódio (NaCl) PM 58,45 (Reagen®)
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Gibco BRL®)
- Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) PM 155,99 (Reagen®)
- Fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) PM 141,96 (Synth®)
- Hidroximetil amino metano - TRIS 99% PM 121,14 (Invitrogen®)
- Imunoglobulina de coelho anti-IgG bovina conjugada com peroxidase (Sigma® Co., EUA)
- Leite em pó desnatado (Molico-Nestlé)
- Orthophenylene diamine (OPD, Sigma® Co, EUA)
- Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) PM 34,01 (Merck®)
- Polietilenoglicol 6000 (PEG) (Sigma® Co., EUA)
- Soro albumina bovina (SAB) (InLab®)
- Tween 20 (Sigma®Co. EUA)

#### 1.2. Cultivo celular

- Anfotericina B (Sigma® CO, EUA)
- DMEM - Dulbecco's modified Eagle Medium (Gibco BRL®)
- Fungizone™ Antimycotic, liquid (Gibco BRL®)
- Gentamicin Reagent Solution (10 mg/mL), liquid (Sigma® CO, EUA)
- Soro fetal bovino (SFB) (Gibco, BRL®)
- Trypsin, 2,5% (1X), liquid (Gibco, BRL®)

## 2. Soluções e Tampões

### ■ Tampão de adsorção (Carbonato / Bicarbonato de Sódio)

- 2,93 g de bicarbonato de sódio (35 mM)
- 1,59 g de carbonato de sódio (15 mM)
- H<sub>2</sub>O bd qsp 1000 mL
- pH 9,6

### ■ Tampão fosfato salina (PBS)

- 21,25 g de cloreto de sódio (150 mM)
- 0,39 g de fosfato de sódio monobásico (1 mM)
- 3,3 g de fosfato de sódio dibásico anidro (9,3 mM)
- H<sub>2</sub>O bd qsp 1000 mL
- pH 7,6

### ■ Tampão fosfato salina Tween 20 a 0,05% (PBST 0,05%)

- 1000 mL de PBS
- 0,5 mL de tween 20
- pH 7,6

### ■ Solução de bloqueio

- 0,5 g de leite em pó desnatado
- PBST 0,05% qsp 10 mL

### ■ Solução diluente do soro

- 0,1 g de leite em pó desnatado
- 1,0 mL de solução de célula
- PBST 0,05% qsp. 10 ml

### ■ Diluente do conjugado

- 0,1 g de Soroalbumina bovina (SAB)
- PBST 0,05% qsp. 10 mL

### ■ Solução do conjugado (1:20.000)

- 1 uL de imunoglobulina de coelho anti-IgG bovina conjugada com peroxidase
- 20 mL do diluente do conjugado

**■ Tampão ácido cítrico/fosfato**

- 19,21 g de ácido cítrico (0,1 M)
- 28,39 g de fosfato de sódio dibásico (0,2 M)
- H<sub>2</sub>O bd qsp 1000 mL
- pH 5,0

**■ Solução do substrato**

- 10 mL de tampão ácido cítrico/fosfato
- 4 ug de orthophenylene diamine (OPD)
- 6 uL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

**■ Solução de parada da reação (STOP)**

- 147,12 mL de ácido clorídrico 3 N
- H<sub>2</sub>O bd qsp.1000 mL

*3. Protocolo da técnica de Elisa indireto*

- Adsorver microplacas de poliestireno com 96 cavidades (Nunc-Immuno Plate Maxisorp®, Dinamarca) com 70 ug/cavidade de antígeno em tampão carbonato/bicarbonato de sódio, pH 9,6.
- Incubar por 18h a 4°C em câmara úmida
- Lavar a microplaca 6 X com PBST 0,05%
- Adicionar 150 uL de solução de bloqueio em cada cavidade
- Incubar por 60 min a 37°C em câmara úmida
- Lavar a microplaca 3 X com PBST 0,05%
- Adicionar 100 uL/cavidade de cada soro a ser testado na diluição 1:100 em PBST 0,05% acrescido de células MDBK (10%) e leite em pó desnatado (1%)
- Incubar por 90 min a 37°C em câmara úmida

- Lavar a microplaca 3 X com PBST 0,05%
  
- Adicionar 100 uL/cavidade de imunoglobulina de coelho anti-IgG bovina conjugada com peroxidase diluída a 1:20.000 em PBST 0,05% acrescido de 1% de soroalbumina bovina
  
- Incubar por 30 min a 37°C em câmara úmida
  
- Lavar a microplaca 3 X com PBST 0,05%
  
- Adicionar 100 uL/cavidade de tampão ácido cítrico/fosfato acrescido de 0,01% orthophenylene diamine e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  
- Incubar por 15 min a temperatura ambiente em câmara escura
  
- Interromper a reação pela adição de 25 uL/cavidade de solução STOP.
  
- Incluir em cada microplaca controles positivo, negativo, do conjugado e do substrato.
  
- Mensurar a Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro para microplacas (Emax®, IDEXX Laboratories, Inc., EUA) em filtro 490 nm.

**ANEXO**

## ANEXO

### Normas para publicação no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira

[www.scielo.br/revistas/pvb/pinstruc.htm](http://www.scielo.br/revistas/pvb/pinstruc.htm)

#### Objetivo e política editorial

O objetivo da revista Pesquisa Veterinária Brasileira é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

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.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista Pesquisa Veterinária Brasileira, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os editores, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

#### Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, *Abstract*, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (ou combinações destes três últimos), Agradecimentos e Referências:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um *Abstract*, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o Resumo deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de

indexação; nos trabalhos em inglês, Resumo e *Abstract* trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) 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;

e) em Material e Métodos devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) 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, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na Discussão os resultados devem ser discutidos 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;

h) as Conclusões devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

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

j) 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 os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

## **2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:**

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; 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; Resumo e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

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 dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou 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, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; 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 superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os quadros deverão ser explicativos por si mesmos; 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 de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.