

Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sangüíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados

Detection of antibodies to the bovine viral diarrhoea virus in serum, in individual milk and in bulk tank milk from unvaccinated herds

Fabio Carvalho DIAS¹;
Samir Issa SAMARA¹

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal - SP

Resumo

Pela pesquisa de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVD), utilizando o teste de ELISA indireto, foi estudada a correlação existente entre a proporção de vacas lactantes e a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão. Para isso foram analisadas amostras de soro sangüíneo e de leite individual de 376 vacas lactantes não vacinadas, provenientes de 10 propriedades localizadas nas regiões Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo, assim como uma amostra do leite do tanque de expansão de cada rebanho. Em todas as propriedades foram encontradas vacas reagentes no soro sangüíneo, cuja frequência variou de 12,28 a 100,00%. Já a análise do leite individual não revelou animais reagentes em duas propriedades, e nas demais a frequência variou de 5,26 a 70,83%. Foram detectados anticorpos no leite do tanque de expansão das propriedades cuja proporção de soros sangüíneos reagentes foi igual a ou maior que 82,86%, e cuja proporção de leites individuais reagentes foi igual a ou maior que 32,14%.

Palavras-chave

Diarreia Viral Bovina.
Anticorpos.
Leite.
Soro sangüíneo.
ELISA.

Correspondência para:

FABIO CARVALHO DIAS
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP
Via de acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, km 05
14884-900 - Jaboticabal - SP
e-mail: carvalhodias@axnet.com.br

Recebido para publicação: 11/07/2002
Aprovado para publicação: 06/05/2003

Introdução

A Diarreia Viral Bovina (BVD) é uma enfermidade que acomete os bovinos e apresenta grande importância econômica em todo mundo^{1,2,3}, comprometendo o desempenho reprodutivo e produtivo dos animais e gerando perdas que muitas vezes são atribuídas a outras infecções. No Brasil a enfermidade é

pouco conhecida entre os criadores, e até mesmo por alguns médicos veterinários. Após a infecção, o vírus pode promover um quadro de doença clínica ou assintomática, que afeta os sistemas respiratório, reprodutivo, imune e digestivo, algumas vezes chegando a ser fatal².

Atualmente o agente etiológico da BVD é definido como um RNA vírus pertencente ao gênero *Pestivirus* e

à família *Flaviviridae*⁴. O vírus da BVD apresenta dois biotipos baseados na sua replicação em culturas de células: citopatogênico e não citopatogênico⁵ e dois diferentes genótipos, que são denominados vírus da BVD tipo 1 e vírus da BVD tipo 2⁶.

O principal fator na disseminação natural do vírus da BVD é a existência de um animal persistentemente infectado (PI). A infecção do feto bovino com o biotipo não citopatogênico antes do desenvolvimento da competência imunológica pode resultar na geração de um animal que apresente uma infecção persistente com o vírus da BVD por toda sua vida^{7,8}. Em termos gerais, a infecção transplacentária é particularmente prejudicial durante os primeiros cento e oitenta dias de gestação, podendo então resultar, além do nascimento de bezerros PI, em morte fetal, deformidades congênitas^{9,10}, natimortos, nascimento de bezerros fracos, débeis, prematuros e com alterações no crescimento¹¹.

As análises de amostras de soro sanguíneo para a pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD são comumente utilizadas como meio de diagnóstico da infecção, mas amostras de leite também podem ser apropriadas para detecção de animais reagentes¹². O desenvolvimento do teste de ELISA para pesquisar anticorpos contra o vírus da BVD em leite de conjunto do tanque de expansão facilitou o diagnóstico de situação da enfermidade nos rebanhos¹³, pois a análise sorológica de um número representativo de animais pode mostrar se o rebanho teve contato com o vírus ou não, porém na maior parte das vezes torna-se onerosa para o criador, principalmente quando se refere a grandes rebanhos.

Baseando-se nisso, o objetivo deste estudo foi verificar a presença da

infecção pelo vírus da BVD em vacas lactantes de rebanhos leiteiros não vacinados, pela pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto do tanque de expansão proveniente de todos os animais. A partir dos dados obtidos, foram verificadas as correlações existentes entre a presença de anticorpos no soro sanguíneo e no leite de cada animal, bem como entre a proporção de animais soropositivos lactantes e a presença de anticorpos contra o vírus da BVD no leite de conjunto do tanque de expansão.

Material e Método

O estudo foi realizado em dez rebanhos leiteiros, sendo cinco localizados na região Sul do Estado de Minas Gerais e cinco na região Nordeste do Estado de São Paulo, entre os meses de março e junho de 2000. As propriedades estudadas no Sul do Estado de Minas Gerais estavam localizadas nos municípios de Machado, Poço Fundo e Turvolândia, e no Nordeste do Estado de São Paulo, nos municípios de Jaboticabal, Aramina, Ituverava e Morro Agudo.

Os rebanhos eram constituídos de animais da raça holandesa preta e branca ou mestiços de holandeses, não possuíam histórico de vacinação anterior e eram rebanhos “fechados” ou apresentavam o mínimo de movimentação de animais. Foram utilizadas somente as vacas em produção, em qualquer fase de lactação, independentemente de idade e volume de produção. O número de animais era variável conforme a propriedade, no mínimo vinte e no máximo setenta animais. No total foram analisados trezentos e setenta e seis animais, sendo duzentos e quarenta e cinco na região Sul do Estado de Minas Gerais e cento e trinta e um na região Nordeste do

Estado de São Paulo.

Para o desenvolvimento do estudo foi feita apenas uma visita por propriedade, oportunidade em que foram coletadas amostras de sangue e leite individualmente de cada vaca lactante e uma amostra do leite de conjunto do tanque de expansão. O procedimento adotado quanto à colheita foi idêntico para todas as propriedades estudadas. Desse modo, foram coletadas trezentos e setenta e seis amostras de soro sanguíneo, trezentos e setenta e seis amostras individuais de leite e dez amostras do leite de conjunto do tanque de expansão, totalizando setecentos e sessenta e duas amostras.

As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal mediana, com agulhas descartáveis, em frascos esterilizados tipo “vacutainer” de 10 mL e sem aditivos. Para as amostras de leite individual foram colhidos 40 mL de leite em frascos esterilizados, específicos para colheita de leite, já contendo uma pastilha do conservante Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) Broad Spectrum Microtabs II/D & F Control Systems, Inc.. A amostra do leite de conjunto foi colhida após o término da ordenha e a homogeneização do leite armazenado no tanque de expansão, na mesma quantidade e no mesmo tipo de frasco da amostra de leite individual. Todas as amostras de leite, individual e de conjunto, foram centrifugadas a 2.000 rpm por cinco minutos para remoção da camada de gordura. Também o soro sanguíneo foi obtido pelos processos usuais de laboratório. Todo este material foi armazenado a -20°C até o momento da realização dos exames, quando foram descongelados.

A detecção de anticorpos contra o vírus da BVD foi realizada pela técnica do ELISA no soro sanguíneo, conforme descrito por Chu et al.¹⁴ e

Howard, Clarke e Brownlie¹⁵, e no leite desnatado, conforme descrito por NISKANEN et al.²⁰, usando um “kit” (CHEKIT BVD-SERO – Dr. BOMMELI AG / Liebefeld – Bern - Swiss) comercial de ELISA indireto. Esse mesmo “kit” foi utilizado para a análise das amostras de soro sanguíneo e para as amostras de leite desnatado.

Para verificar a existência de correlação entre anticorpos contra o vírus da BVD presentes no soro sanguíneo e no leite originários do mesmo animal, os dados obtidos foram submetidos ao teste exato de Fischer. Já a correlação entre a proporção de animais lactantes soropositivos e anticorpos detectáveis contra o vírus da BVD no leite de conjunto do tanque de expansão foi expressa em porcentagem simples.

Resultados

Em todas as propriedades foram encontrados animais reagentes para o teste realizado com as amostras de soro sanguíneo, cujas proporções variaram de 12,28 a 100,00%, num total de duzentos e quinze animais reagentes (57,18%) dos trezentos e setenta e seis analisados. Para as amostras de leite individual, duas propriedades não apresentaram animais reagentes, e nas outras as proporções variaram de 5,26 a 70,83%, num total de noventa e oito animais reagentes (26,07%) dos trezentos e setenta e seis analisados (Tabela 1).

Na Tabela 1 também são demonstradas as porcentagens de animais com resultados concordantes nos testes para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD no soro sanguíneo e no leite individual, bem como a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão. Nessa tabela nota-se que a porcentagem de animais com resultados concordantes no soro

sangüíneo e no leite individual variou de 0 a 70,83% e que foram detectados anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão nos rebanhos em que a concordância de animais que apresentaram anticorpos no soro sangüíneo e leite individual foi igual a ou maior que 32,14%.

Também pode ser observado que anticorpos foram detectados no leite de conjunto nas propriedades 1, 5, 7 e 9, sendo que a porcentagem de animais reagentes no soro sangüíneo nessas propriedades foi igual a ou maior que 82,86%. No entanto, na propriedade 8, não foram detectados anticorpos no leite de conjunto e a porcentagem de animais reagentes no soro sangüíneo foi de 84,00%. Nas demais propriedades, onde não foram detectados anticorpos no leite de conjunto, a porcentagem de animais reagentes no soro sangüíneo foi igual a ou menor que 28,89%.

Na análise estatística, através da

aplicação do teste exato de Fischer, foi observado que, ao agrupar todas as amostras independentemente da propriedade à qual pertencia, existiu uma dependência entre anticorpos presentes no soro sangüíneo e no leite, mostrando resultado significativo ($P < 0,01$). Referindo-se a cada propriedade separadamente, o teste exato de Fischer não foi aplicado nas propriedades 2, 9 e 10, pois os dados obtidos não eram passíveis de estabelecer uma correlação porque em todas as amostras de leite individual das propriedades 2 e 10 não foram detectados anticorpos contra o vírus da BVD, enquanto que na propriedade 9 todas as amostras de soro sangüíneo eram reagentes. Nas propriedades 5, 6 e 7 existiu dependência entre anticorpos presentes no soro sangüíneo e leite individual ($P < 0,01$), assim como na propriedade 3 ($P < 0,05$). Já nas propriedades 1, 4 e 8 não existiu dependência entre os fatores analisados.

Tabela 1

Porcentagem e número de animais reagentes e suspeitos no soro sangüíneo e no leite individual submetidos ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD, porcentagem de animais reagentes concordantes no soro sangüíneo e no leite individual, assim como a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão nas propriedades estudadas nas regiões Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo entre os meses de março e junho de 2000.

Propriedade	nº total de animais	Soro sangüíneo				Leite individual				% reagentes soro sangüíneo e leite individual	Presença de anticorpos no leite tanque de expansão
		Positivo		Suspeito		Positivo		Suspeito			
		%	nº	%	nº	%	nº	%	nº		
1	30	96,67	29	0,00	00	60,00	18	6,66	02	60,00	positivo
2	20	25,00	05	0,00	00	0,00	00	0,00	00	0,00	negativo
3	45	28,89	13	4,44	02	8,89	04	0,00	00	8,89	negativo
4	29	27,59	08	13,79	04	6,90	02	0,00	00	6,90	negativo
5	70	82,86	58	0,00	00	34,28	24	4,29	03	34,28	positivo
6	57	12,28	07	0,00	00	5,26	03	0,00	00	5,26	negativo
7	48	87,50	42	0,00	00	70,83	34	4,17	02	70,83	positivo
8	25	84,00	21	0,00	00	16,00	04	0,00	00	16,00	negativo
9	28	100,00	28	0,00	00	32,14	09	3,58	01	32,14	positivo
10	24	16,67	04	4,16	01	0,00	00	0,00	00	0,00	negativo
Total	376	57,18		215	1,86	07	26,07	98	2,13	08	- -

Discussão

O estudo revelou que 57,18% das amostras de soro sanguíneo analisadas apresentaram anticorpos contra o vírus da BVD enquanto que nas amostras de leite individual, a quantidade de amostras reagentes foi menor do que as do soro sanguíneo, conforme observado na Tabela 1. Esses resultados atestam as afirmativas feitas por Klintevall et al.¹⁶, Kramps et al.¹¹ e Schrijver e Kramps¹⁷, que a quantidade de imunoglobulinas no leite é bem menor do que no soro sanguíneo, além do fato de que a determinação da presença de anticorpos contra o vírus da BVD no soro sanguíneo é mais sensível e específica do que no leite¹².

Todas as amostras reagentes no leite individual eram provenientes de animais que também eram reagentes no soro sanguíneo, o que indica possivelmente a ausência de reações falso-positivas no leite, que poderiam ser causadas por mastite ou resíduos de gordura¹⁶, já que o leite foi colhido de quartos que não apresentavam mastite clínica e foi submetido à centrifugação e diluição conforme instrução do fabricante do “kit”.

A correlação existente entre a proporção de animais lactantes reagentes e a presença de anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão revelou que anticorpos foram detectados nas propriedades em que a proporção de animais reagentes foi igual a ou maior que 82,86% no soro sanguíneo e igual a ou maior que 32,14% no leite individual (Tabela 1). Esses resultados obtidos diferem daqueles encontrados por Niskanen et al.¹⁸, que detectaram anticorpos no leite de conjunto do tanque de expansão em propriedades em que a quantidade de animais reagentes no soro sanguíneo foi igual a ou maior que 4,00%. Entretanto Niskanen¹³ e Fredriksen et

al.¹⁹ verificaram que poucos animais com altos títulos de anticorpos no leite seriam suficientes para que fossem detectados anticorpos no leite de conjunto.

Nas demais propriedades em que não foram detectados anticorpos no leite do tanque de expansão, com exceção da propriedade 8, a quantidade de animais reagentes foi igual a ou menor que 28,89% no soro sanguíneo e igual a ou menor que 8,89% no leite individual (Tabela 1). Na propriedade 8, os resultados encontrados foram divergentes dos demais, pois 84,00% dos animais foram reagentes no soro sanguíneo e somente 16,00% reagentes no leite individual e não foram detectados anticorpos no leite do tanque de expansão. Nesse caso a hipótese mais provável seria que a fonte de infecção poderia ter sido debelada do rebanho, não havendo portanto mais a infecção ativa¹³. É importante salientar que nessa propriedade ocorreu um quadro clínico sugestivo de BVD dois anos antes da realização do experimento, ocasião em que o animal veio a óbito. É bem possível que esse animal teria sido a única fonte de infecção no rebanho e os demais bovinos, após infectados, apresentaram anticorpos detectáveis no soro sanguíneo por um longo período após a infecção ter cessado^{20,21,22}, porém para o leite do tanque de expansão os anticorpos gradativamente diminuíram, até tornarem ausentes²³.

Comparando as proporções entre animais reagentes no soro sanguíneo e reagentes no leite individual, foi verificado que existiram diferenças conforme a propriedade analisada. Enquanto a propriedade 7 apresentou proporções muito próximas de amostras reagentes no soro sanguíneo e no leite individual, respectivamente 87,50% e 70,83%, a propriedade 8 apresentou 84,00% de

amostras reagentes no soro sangüíneo e 16,00% no leite individual. Outro exemplo contrastante foi a propriedade 6, em que a quantidade de animais reagentes no soro sangüíneo foi 12,28%, e no leite individual, 5,26%, e a propriedade 2 apresentou 25,00% de reagentes no soro sangüíneo e nenhuma amostra de leite individual reagente. Essas diferenças entre as proporções sugerem que nas propriedades em que a proporção de animais reagentes no leite individual é maior, esses animais estão sofrendo infecção ativa ou são convalescentes²³.

As análises estatísticas realizadas para a verificação da correlação existente entre anticorpos contra o vírus da BVD presentes no soro sangüíneo e leite individual também comprovam essas diferenças encontradas nas proporções de animais reagentes nas duas amostras. Ao aplicar o teste exato de Fischer, em todas as amostras agrupadas independentemente da propriedade, existiu correlação entre a presença de anticorpos no soro sangüíneo e no leite individual. No entanto, quando o teste foi aplicado nas amostras conforme a propriedade, os resultados encontrados diferiram entre as propriedades, não havendo assim uma correlação efetiva entre eles.

Portanto, no geral, o estudo realizado mostrou que a BVD consiste em mais um problema sanitário com o qual os pecuaristas brasileiros têm de conviver. Tanto é que para Fredriksen, Loken e Odegaard¹⁹, depois da mastite, é a BVD que causa as maiores perdas econômicas nos rebanhos leiteiros em muitos países. Entretanto, mesmo com as dificuldades encontradas, o problema não deve ser deixado de lado. Antes de tomar alguma atitude é necessário realizar o diagnóstico de situação dos rebanhos, ponto inicial em que se torna interessante a utilização

de amostras de leite de conjunto do tanque de expansão, para que se tenha pelo menos um parâmetro para o início das investigações¹³.

A utilização desse tipo de amostra apresenta grandes vantagens práticas para o teste em larga escala de estudos epidemiológicos¹⁶, várias vantagens do ponto de vista econômico tais como a facilidade de obtenção, o exame de todo o rebanho em uma única amostra e o custo é substancialmente mais baixo do que o de métodos que requerem amostras individuais^{23,24,25}. É também útil em programas de erradicação de enfermidades²⁶ e por ser um indicador de infecção ativa nos rebanhos²⁷, fornece a evidência indireta da presença de animais PI no rebanho²⁸.

Por fim, o presente estudo mostrou que a amostra de leite de conjunto do tanque de expansão pode acusar a presença de animais reagentes. Por isto é necessário um cuidado especial na interpretação dos resultados porque existem vários fatores que podem interferir, tais como estágio de infecção dos animais no rebanho, produção individual de leite, período de lactação e presença do animal PI no rebanho. Tudo isso direciona para o desenvolvimento de outras pesquisas que possam dirimir todas essas dúvidas.

Conclusões

A análise dos resultados do presente trabalho, em que foram pesquisados anticorpos contra o vírus da BVD em amostras de soro sangüíneo, de leite individual e de leite de conjunto, permitiu as seguintes conclusões:

1. A infecção foi constatada em todos os rebanhos analisados.
2. Dos animais reagentes no

soro sanguíneo, menos da metade desses animais foi reagente no leite individual.

3. Todo animal reagente no leite individual também foi reagente no soro sanguíneo.

4. O leite do tanque de expansão foi indicativo da presença da infecção quando o rebanho apresentou uma proporção igual a ou maior que 82,86% de animais reagentes no soro sanguíneo.

Summary

The correlation between the proportion of reactor lactating cows and the presence of antibodies to the bovine viral diarrhoea virus (BVD) in bulk tank milk was studied by using the ELISA test. Serum and individual milk samples from 376 unvaccinated lactating cows from 10 herds located in the South region of the State of Minas Gerais and the Northeast region of the State of São Paulo as well as one milk sample from the bulk tank milk of each herd were analysed. Reacting serum samples were found in all the herds, and this occurrence varied from 12.28 to 100.00%. The analysis of individual milk samples did not show reacting cows in two herds, while the other herds had an occurrence varying from 5.26 to 70.83%. Antibodies were detected in bulk tank milk from herds whose proportion of reacting sera was equal to or higher than 82.86%, and whose proportion of reacting individual milk samples was equal to or higher than 32.14%.

Key-words

Bovine viral diarrhoea.
Antibodies.
Milk.
Serum.
ELISA.

Referências

- 1 - BITSCH, V.; RONSHOLT, L. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 627-640, 1995.
- 2 - BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. The clinical significance of genetic variation among bovine viral diarrhoea viruses. **Veterinary Medicine**, v. 91, n. 10, p. 958-961, 1996.
- 3 - HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 521-547, 1995.
- 4 - ROEHE, P. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; MUÑOZ, J. C. P. A situação do vírus da Diarreia Viral Bovina no país. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: [s.n.], 1998. p. 39-48.
- 5 - TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Medicine**, v. 91, n. 9, p. 858-866, 1996.
- 6 - RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66-74, 1994.
- 7 - BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection - a window on the pathogenesis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 447-475, 1995.
- 8 - DUBOVI, E. J. Bovine viral diarrhoea virus. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: [s.n.], 1998. p. 1-19.
- 9 - FRAY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 615-627, 2000.
- 10 - LARSON, B. L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. **Veterinary Medicine**, v. 91, n. 4-6, p. 478-486, 1996.
- 11 - KRAMPIS, J. A.; MAANEN, C. V.; WETERING, G. V.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked

- immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 135-144, 1999.
- 12 - NISKANEN, R.; ALENIOUS, S.; LARSSON, B.; JUNTTI, N. Evaluation of a enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 36, s. n. , p. 113-118, 1989.
- 13 - NISKANEN, R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. **Veterinary Record**, v. 133, n. 14, p. 341-344, 1993.
- 14 - CHU, H. J.; ZEE, Y. C.; ARDANS, A. A.; DAI, K. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bovine sera. **Veterinary Microbiology**, v. 10, s. n. , p. 325-333, 1985.
- 15 - HOWARD, C. J.; CLARKE, M. C.; BROWNLIE, J. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 359-369, 1985.
- 16 - KLINTEVALL, K.; NÄSLUND, K.; SVEDLUND, G.; HAJDU, L.; LINDE, N.; KLINGEBORN, B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. **Journal of Virological Methods**, v. 33, n. 3, p. 319-333, 1991.
- 17 - SCHRIJVER, R. S.; KRAMPS, J. A. Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent formats. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 17, n. 2, p. 550-561, 1998.
- 18 - NISKANEN, R.; ALENIOUS, S.; LARSSON, B.; JACOBSSON, S. O. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. **Archives of Virology**, p. 245-251, 1991. Supplement 3.
- 19 - FREDRIKSEN, B.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S. A. The duration of antibodies against bovine virus diarrhoea virus in bulk milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 39, n. 1, p. 89-98, 1998.
- 20 - DUFFELL, S. J.; HARKNESS, J. W. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. **Veterinary Record**, v. 117, n. 10, p. 240-245, 1985.
- 21 - FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S. A. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Record**, v. 144, n. 5, p. 111-114, 1999.
- 22 - SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.
- 23 - LINDBERG, A. L. E.; ALLENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 197-222, 1999.
- 24 - PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; ALENIOUS, S.; CRANWELL, M. P.; PRITCHARD, G. C.; DREW, T. W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 142, n. 11, p. 385-391, 1998.
- 25 - VAN OIRSCHOT, J. T. The BVDV situation in Europe. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais ...** Santa Maria: [s.n], 1998. p. 33-37. 26 - HARTMAN, A.; VAN WUIJCKHUISE, L.; FRANKENA, K.; FRANKEN, P.; WEVER, P.; DE WIT, J.; KRAMPS, J. Within-herd BHV-1 prevalence prediction from an ELISA on bulk milk. **Veterinary Record**, v. 140, n. 3, p. 484-485, 1997.
- 27 - HOUE, H.; PALFI, V. Estimation of herd incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in herds previously without animals persistently infected with BVDV. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, n. 2, p. 133-137, 1993.
- 28 - HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 89-107, 1999.