

Pesquisa do vírus da diarreia viral bovina em bovinos jovens

Investigation of bovine viral diarrhea virus in young bovines

Rejane Peixoto NORONHA¹;
Gubio Soares CAMPOS¹;
Sílvia Ines SARDI¹

¹Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA

Palavras-chave
VDVB.
Sorologia.
Isolamento.
Bovinos

Resumo

Nesta pesquisa analisamos a presença do vírus da Diarreia viral bovina em bovinos jovens através de um estudo sorológico e isolamento viral. A técnica de seroneutralização detectou de um total de 220 bovinos, 123 (56%) animais sorologicamente positivos. A distribuição dos títulos de anticorpos soroneutralizantes (TSN), mostrou que 82% das amostras apresentaram TSN de até 512, enquanto que 18% apresentaram TSN maiores que 512. O isolamento viral a partir da fração leucocitária desses bovinos, confirmou a presença do vírus em quatro bovinos aparentemente saudáveis e de um bezerro com sintomatologia respiratória. Os cinco isolados virais não apresentaram efeito citopático nos cultivos celulares.

Correspondência para:

SILVIA INES SARDI
Laboratório de Virologia, 2º andar
Departamento de Bio-interação
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Av. Reitor Miguel Calmom s/n- Vale do Canela
40110-100 - Salvador - Bahia
e-mail: sissardi@yahoo.com.br

Recebido para publicação: 13/11/2003
Aprovado para publicação: 17/09/2003

Introdução

O vírus da Diarreia Viral Bovina (VDVB) causa uma das doenças virais, mas importantes do trato gastrointestinal e reprodutivo dos bovinos. O agente etiológico é um vírus RNA, que possui envelope, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*¹. As infecções por este vírus levam a formas variadas de manifestações clínicas ou subclínicas tais como lesões orais, ulcerações e erosões no aparelho digestivo, abortos, malformações congênitas e mortalidade neonatal, cios repetidos, infertilidade ou diminuição da produção de leite².

Os padrões clínicos da infecção pré-natal e pos-natal dentro do rebanho dependerá da interação de vários fatores, tais como a idade do animal, estado imunológico e a cepa do vírus infectante. A infecção de vacas prenhes com uma cepa não citopatogênica antes do

amadurecimento do sistema imune do feto, pode resultar em nascimentos de bezerros persistentemente infectados (PI). Estes bezerros PI são soronegativos, eliminam vírus e são imunotolerantes ao vírus infectante homólogo, mas existe a possibilidade de eles se infectarem com uma cepa citopática de VDVB e contraírem a enfermidade fatal Doença das Mucosas³.

A prevenção da infecção pré-natal e nascimentos de animais PI constituem a base do controle da doença o qual implica um estrito controle de vacas mães e filhos. Bovinos que nascem PI representam um fator de perpetuidade do vírus no rebanho, conseqüentemente é importante sua detecção e remoção do plantel. Uma eficiente estratégia para o controle da doença depende do conhecimento da epidemiologia da infecção, do estado imunológico do rebanho, e principalmente para o feto ou

bezerro, de um diagnóstico confiável^{3,4,5}.

No estado da Bahia, os estudos a respeito da ocorrência da doença foram realizados por Galvão, Ribeiro e Rodrigues⁶ e Ribeiro et al.⁷. Desde então, os estudos cessaram e não foram adotadas medidas de controle. Portanto, o propósito desta pesquisa foi conhecer a situação atual da Diarreia Viral Bovina, através de um estudo sorológico e isolamento do vírus que circula na população bovina regional.

Material e Método

Amostragem

Foram utilizados bovinos (n=156), machos e fêmeas, de um a quatro anos de idade, de oito propriedades provenientes de municípios diferentes do estado da Bahia, sem antecedentes de vacinação, nem diagnóstico prévio de Diarreia Viral Bovina. O número de amostras de cada rebanho correspondeu no mínimo, a 10% da população bovina total. Também foram obtidas amostras (n=64) do matadouro local de bovinos (mesmas condições) provenientes de outros três municípios diferentes.

Cultura de células

A linhagem celular utilizada foi Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) livre de VDVB, cultivada em Minimum Essential Medium-Eagle (MEM-E, GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO BRL, Grand Island, NY) e livre de VDVB.

Vírus

O vírus utilizado foi o VDVB- cepa NADL, biotipo citopático (National Veterinary Service Laboratories-USDA-USA) inoculado a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,63 em monocamadas de MDBK. O título infeccioso do vírus

cepa NADL obtido foi de $10^{8,9}$ DICT₅₀/ml, calculado segundo o método de Reed e Muench¹⁰.

Técnica de Soroneutralização

A reação de soroneutralização para titulação de anticorpos foi realizada segundo Carbrey, Brow e Chow⁸. O total dos soros (n=220) foi inativados a 56°C durante 30 minutos, posteriormente diluídos em base dupla desde 1:4, misturados com 100 DICT₅₀, e incubados a 37°C durante 1 hora. A mistura soro-vírus foi inoculada em células MDBK cultivadas em microplacas de 96 poços. Após 96 horas a 37°C em atmosfera de 5.00% de CO₂, foi realizada a leitura por efeito citopático. O título soroneutralizante (TSN) foi expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar 100 DICT₅₀ em 50,00% dos poços seguindo o método de Reed e Muench¹⁰.

Em cada prova foram realizados os seguintes controles: controle da titulação do vírus VDVB, controle de soros negativo e positivo de título conhecido e controle de células MDBK.

Isolamento viral

A partir da fração leucocitária

De um total de 220 bovinos testados sorologicamente, 145 animais foram utilizados para isolamento viral da fração leucocitária. A fração leucocitária do sangue foi obtida após a lise de hemáceas com NH₄Cl 0,15M a 37 °C durante 10 minutos. Este processo foi repetido por 3 vezes. Por último uma lavagem com uma solução de PBS (ClNa 135 mM, ClK 2,7 mM, HPO₄Na₂ 7 H₂O 8mM, PO₄H₂K 1,5mM, pH 7,2-7,4), e logo ressuspensa em meio MEM-E com 2,00% de soro equino (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) para ser congelada a -20°C. A fração leucocitaria foi co-cultivada com células MDBK em meio MEM-E com 5.00% de soro fetal

bovino inativado, HEPES 0.02M, e solução de antibiótico/antimicótico (Fungizone -GIBCO BRL, Grand Island, NY), em microplacas de 24 poços, a 37°C em estufa com atmosfera de 5.00% de CO₂. As culturas celulares eram examinadas diariamente e após quatro dias, submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento, para realizar com o sobrenadante mais 3 passagens em células. A última passagem (4a passagem) foi feita em tubos Leighton. Após três dias de incubação a 37°C, as lamínulas com células MDBK foram fixadas em acetona (100,00%) a -20°C por 10 minutos e submetidas à técnica de imunofluorescência indireta para detecção do antígeno viral.

A partir da secreção nasal

A amostra de secreção nasal foi colhida com swabs estéreis e transportada em meio de cultura MEM-E com antibiótico/antimicótico (Fungizone -GIBCO BRL, Grand Island, NY). Posteriormente, foi centrifugada a 6000 rpm por 20 min a 10°C, e o sobrenadante foi inoculado em culturas de células MDBK seguindo o mesmo procedimento para a fração leucocitária.

Imunofluorescência indireta

As lamínulas fixadas foram incubadas com soro hiperimune caprino anti-BVDV (1:2000) (VMRD-Washington- USA) e incubadas com conjugado anti-IgG caprino-FITC (1:400-Sigma Chemical Co, St Louis, MO.). Uma lavagem final de 3 minutos foi feita com azul de Evans 0,01%. As lamínulas foram montadas em lâminas com glicerina (50% em solução PBS) e observadas no microscópio de fluorescência.

Análise estatística

Para a análise estatística, foi calculada a prevalência e o intervalo de confiança de 95 % com aproximação

normal para as prevalências pontuais¹¹.

Resultados

Deteção de anticorpos soroneutralizantes

Os resultados obtidos com a técnica de soroneutralização mostram que das 220 amostras analisadas, 124 (56%) foram soropositivas. Na Tabela 1 estão expostos os resultados nos diferentes rebanhos. Nela observa-se que a prevalência de anticorpos variou de 20 a 87,50%, sendo que na maioria dos rebanhos a porcentagem de animais soropositivos foi, no mínimo, de 50,00%. No caso dos rebanhos B e C, estes tiveram uma maior porcentagem de soronegativos. No matadouro, o resultado coincidiu com os dados obtidos dos rebanhos já que também superou o 50,00% de soropositividade.

Quando foram avaliados os resultados em relação ao sexo dos animais, observou-se que de 87 machos, 47 (54%) foram soropositivos, enquanto que de 133 fêmeas, 77 (58%) foram positivas. Esta diferença não foi estatisticamente significativa (RP=0,93 [0,73 – 1,18]%).

Dos 124 soros positivos, foram processadas 92 amostras para a titulação dos anticorpos neutralizantes. Como pode ser observado na Tabela 2, as amostras foram divididas em cinco grupos segundo o título obtido. Do total das amostras avaliadas, 25 (27%) apresentaram TSN iguais ou maiores do que 4 até 32, 26 amostras (28%) com títulos maiores do que 32 até 128, 25 (27%) com TSN maiores do que 128 até 512, 10 (11,20%) maiores do que 512 até 1024 e finalmente 6 amostras (6,80%) apresentaram TSN maiores do que 1024.

Isolamento Viral

Isolamento do VDVB da fração leucocitária

Das amostras da fração leucocitária analisadas (n=145), o BVDV

Tabela 1

Detecção de anticorpos neutralizantes contra o vírus da diarreia viral bovina em 220 soros bovinos de diferentes rebanhos. Bahia, 2001

REBANHO	Nº AMOSTRAS (n=220)	SOROS POSITIVOS (n=124)		
		N•	%	∞ 95.00%
A	08	07	87,5	±22,9
B	15	03	20	±20
C	31	12	38,7	±17,1
D	29	19	65,5	±17,3
E	18	12	66,6	±24,9
F	10	06	60	±30
G	21	12	57,2	±21,2
H	24	13	54,2	±20
MATADOURO	64	40	62,5	±12

N• – número de animais soropositivos no rebanho

% - porcentagem de animais soropositivos no rebanho

∞ 95.00% - intervalo de confiança de 95.00% (P<0,05)

Tabela 2

Titulação de anticorpos neutralizantes contra vdvb em 92 amostras de soros bovinos. Bahia, 2001

TÍTULOS DOS ANTICORPOS NEUTRALIZANTES (n=92)					TOTAL	DE
AMOSTRAS						
>4-32	>32-128	>128-512	>512-1024	>1024		
25	26	25	10	6	92	

Tabela 3

Isolamento do VDVB e título de anticorpos neutralizantes nos animais infectados Bahia, 2001

ANIMAL/REBANHO	AMOSTRA 1		AMOSTRA 2	
	ISOLAMENTO VIRAL	TSN	ISOLAMENTO VIRAL	TSN
01/D	+	45	-	180
02/D	+	120	-	1256
03/H	+	-	-	>4096
04/H-Bezerro	+	NR	+	NR
05/D-Bezerro	+	NR	=	NR

NR: Não realizado

TSN: Título Soro-neutralizante = Morreu

foi detectado em 3 (2%). A Tabela 3 mostra os resultados obtidos no isolamento. Nesta observa-se que, duas amostras (01-02/D) pertenciam ao rebanho D, cujo histórico incluía mortalidade de bezerros, embora os animais adultos estivessem em boas condições de saúde. Os animais em questão eram vacas da raça girolando, adultas, em lactação, com idade aproximada de quatro anos que apresentavam anticorpos neutralizantes de TSN 44, 7, e TSN 119,5, respectivamente. A terceira amostra (03/H) provinha do rebanho H, cujo histórico incluía abortos e repetições de cio. A amostra provinha de uma vaca, com idade aproximada de quatro anos, em lactação, condição corporal razoável

e soronegativa à titulação de anticorpos. Uma outra amostra (04/H) que provinha deste mesmo rebanho H também foi positiva, sendo que correspondia ao bezerro-filho desta vaca. A segunda amostra de sangue e/ou soro destes animais foram analisadas entre um até seis meses depois. Nas duas vacas do rebanho D, não foi possível isolar o VDVB a partir da fração leucocitária da segunda amostra. Estes animais apresentaram aumento de quatro vezes no título de anticorpos de TSN 44,7 para 177,8 e TSN 119,5 para 1256 (Tabela 3). No caso da vaca do rebanho H (03/H) foi notificado que havia sido vacinada com uma vacina comercial inativada contra o VDVB. Ao avaliar o título de anticorpos, este mostrou um valor

notoriamente alto sendo igual ou maior do que 4096 e o isolamento viral foi negativo (Tabela 3). Entretanto, no bezerro-filho (04/H) desta vaca a segunda amostra da fração leucocitária (após um mês) foi positiva ao isolamento viral.

Isolamento do VDVB de secreção nasal

O VDVB foi isolado na secreção nasal de um bezerro de três meses de idade (Tabela 3). O bezerro procedia do rebanho D, cujo histórico incluía uma síndrome que acometia animais de até seis meses de idade, caracterizada por anorexia, perda de peso, alopecia, secreção nasal e ocular, finalmente diarreia seguida de morte. Entretanto, não foi possível a detecção do vírus na fração leucocitária deste animal. O vírus isolado também não apresentou efeito citopático no cultivo celular.

Discussão

O VDVB encontra-se disseminado pelos rebanhos bovinos em todo o mundo e relatos anteriores mostram a ocorrência deste vírus também no Brasil^{9,12,13,14}. Nesta pesquisa, encontramos 56% de animais soropositivos de um total de 220 amostras analisadas. Em vista da prevalência de anticorpos encontrada para o VDVB, pode-se perceber que a infecção pelo vírus é um fato freqüente nos rebanhos analisados. Na distribuição dos títulos de anticorpos soroneutralizantes, observamos que 82% das amostras apresentaram TSN até 512, enquanto que 18% apresentaram títulos maiores do que 512. Nos anteriores estudos na Bahia^{6,7}, não foram analisados os títulos de anticorpos neutralizantes dos animais, o que não permite a comparação com estes dados. Entretanto, Figueredo et al.¹⁵, com uma prevalência de anticorpos semelhante, encontrou títulos menores ao analisar 287 amostras de soros bovinos no estado de Minas Gerais, mostrando que 81,60% de amostras apresentaram títulos até a diluição 1:32. No nosso estudo, observamos que uma pequena

porcentagem (25.00%) teve títulos entre 4 a 32, sendo que a maioria das amostras (75.00%) apresentou TSN maiores a 32. Na pesquisa realizada por Frederiksen et al.¹⁶, demonstraram que em animais infectados natural e experimentalmente, os títulos de anticorpos neutralizantes contra o VDVB variam de 256 a 4096 e nunca menores do que 64, inclusive três anos após a infecção. Por outro lado, estudos epidemiológicos demonstram que a soropositividade entre animais jovens é indicativo de infecção recente e que, existe uma alta probabilidade da existência de animais PI dentro desses rebanhos^{17,18}. A eliminação destes animais é um dos principais objetivos dos programas de controle da doença, já que eles são os responsáveis pela manutenção do vírus no rebanho^{2,3,5}.

A presença do VDVB na fração leucocitária não diferencia infecções agudas e persistentes, sendo necessárias análises de amostras seriadas após 1 mês ou mais do mesmo animal. Neste caso o vírus será detectado na segunda amostra de sangue do animal PI, não assim no caso de animais com infecção aguda^{5,17}.

No nosso estudo, detectamos a presença do vírus na fração leucocitária de três bovinos aparentemente saudáveis, sem sintomas da doença. É provável que dois deles, estivessem passando por infecção aguda e não fossem animais persistentemente infectados, já que o vírus não foi isolado na segunda amostra e apresentaram uma soroconversão com aumento em quatro vezes dos títulos de anticorpos. Em relação ao terceiro animal, a possibilidade de ser um animal persistentemente infectado não deve ser descartada. O VDVB foi detectado na primeira amostra da fração leucocitária, quando o animal era soronegativo, mas não foi isolado na segunda amostra. Neste caso a não detecção do vírus pode ser atribuída aos altos títulos de anticorpos soroneutralizantes possivelmente decorrentes da vacinação, anterior a coleta da segunda amostra. Sabe-se que altos níveis de anticorpos formam complexos imunes vírus-anticorpos que podem prejudicar o isolamento do vírus circulante no sangue¹⁹. Um dado

interessante é que na ocasião da coleta da segunda amostra, esta vaca encontrava-se lactante. A análise da fração leucocitária do bezerro filho desta vaca revelou a presença do vírus no sangue (quarto isolamento), fato confirmado com a análise de amostras pareadas no intervalo de um mês. Este resultado indicaria a possibilidade de que mãe e filho fossem animais com infecção persistente, já que uma fêmea PI que chega a reprodução produz um bezerro PI.

Em relação ao quinto isolamento do VDVB, da secreção nasal do bezerro de três meses de idade, mostra que animal estava passando nesse momento por uma infecção aguda. Ele provinha do rebanho D, o mesmo no qual foi isolado o vírus da fração leucocitária de duas vacas, corroborando ainda mais com a hipótese de infecção aguda. O bezerro apresentava sinais clínicos condizentes com a infecção aguda pelo VDVB. Acredita-se que a doença aguda severa relacionada à alta mortalidade entre animais jovens seja causada pelo VDVB-2. Este genótipo está relacionado a surtos de síndrome hemorrágica, caracterizada por leucopenia, febre, diarreia, trombocitopenia, hemorragia e morte^{20,21}.

Os isolados, tanto da fração leucocitária como da secreção nasal obtidos no presente estudo não apresentaram efeito citopático nos cultivos celulares, resultados que

coincidem com outros autores que citam que o biótipo não citopático é o normalmente isolado no campo^{3,9,12}.

Conclusões

No presente estudo, a pesquisa sorológica demonstrou a incidência atual da infecção por VDVB nos rebanhos bovinos da região, assim como pela primeira vez na Bahia, o isolamento do vírus, o que mostra infecções virais ativas nos animais jovens. Contudo, são necessários mais estudos, principalmente em relação à caracterização antigênica e genética desses isolados, para uma melhor compreensão da biologia do vírus que circula no meio. No entanto, em vista da prevalência de 56% encontrada, torna importante alertar sobre o controle desta doença, percebendo que as consequências deste descaso são os prejuízos decorrentes do caráter, as vezes, sub-clínico da doença com menor produtividade no rebanho.

Agradecimentos

Ao CADCT-FAPESB pela subvenção do projeto e CAPES.

Summary

In this research we analyzed the presence of Bovine viral diarrhea virus in young bovines. We performed a serological study and viral isolation in 220 bovines from different counties. The serum-neutralization assay detected 123 (56%) positive bovines to BVDV and showed that 82% of the samples had SNT up to 512 and 18%, more than 512. It was collected the buffy coats from these bovines to performed the viral isolation in culture cells and the presence of the virus was confirmed in four healthy bovines and one calves with respiratory symptoms. The five viral isolaments are non-citophatic strains.

Key-words
BVDV.
Serology.
Isolament.
Cattle.

Referências

- 1- COLLET, M. S.; LARSSON, R.; BELZER, S.K.; RETZEL, E. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology*, v. 165, n. 1, p. 200-208, 1988.
- 2- BAKER, J. C. Clinical Aspects of Bovine Virus Diarrhoea Virus Infection. *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.*, v. 9, n. 1, p. 25-41, 1990.
- 3- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.*, v. 9, n. 1, p. 43-59, 1990.
- 4- MOERMAN, A.; STRAVER, P. J.; DE JONG, M.C.M.; QUAK, J.; BAANVIRGER, T. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Veterinary Record*, v. 132, n. 25, p. 622-626, 1993.
- 5- SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.
- 6- GALVÃO, C. L.; RIBEIRO, M. B.; RODRIGUES, F. M. Avaliação de anticorpos neutralizantes para o complexo doença das mucosas-diarréia a vírus em bovinos da MRH Piemonte da Diamantina. *Boletim EPABA*, n. 4, 1983.
- 7- RIBEIRO, M. B.; GALVÃO, C. L.; COSTA, A. R.; RODRIGUES, F. M.; SUZART, J. C. C. Infecções pelo vírus da Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecçiosa, Diarréia Viral Bovina e Parainfluenza 3, detectadas por meio de avaliação sorológica no Estado da Bahia. *Boletim EPABA*, n. 11, 1987.
- 8- CARBREY, E. A.; BROWN, L. N.; CHOW, T. L. Recommended standard laboratory techniques for infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhoea and shipping fever. *Proc US Anim. Hlth Ass*, v. 75, p. 629-648, 1971.
- 9- CANAL, C. W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 63, n. 2-4, p. 85-97, 1998.
- 10- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. *American Journal of Hygiene*, v. 27, n. 39, p. 493-497, 1938.
- 11- THRUSFIELD, M. Surveys. In: THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. USA: Iowa State University Press, 1997. p. 178-197.
- 12- BOTTON, S. A.; SILVA, A. M.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Antigenic characterization of brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz. J. M. Biol. Res.*, v. 31, n. 11, p. 1429-1438, 1998.
- 13- PITUCO, E.; FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), número do simpósio, 1998, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: Pallotti, 1998. p. 49-57.
- 14- ROEHE, P. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; MUNOZ, J. C. P. A situação do vírus da diarréia viral bovina no país. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), número do simpósio, 1998, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: Pallotti, 1998. p. 39-48.
- 15- FIGUEIREDO, H. C. P.; VIEIRA, T. R.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C. Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarréia bovina a vírus (VDBV) em Minas Gerais. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n. 4, p. 8-11, 1997.
- 16- FREDRIKSEN, B.; SANDKIK, T.; LØKEN, T.; ØDEGAARD, 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.
- 17- HOUE, H. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Research in Veterinary Science*, v. 53, n. 3, p. 320-323, 1992.
- 18- LINDBERG, A. L.; ALENUS, S. Principles of eradication of /Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology*, v. 64, n. 2-3, p. 197-222, 1999.
- 19- BROCK, K. V.; POTGIETER, L. N. D. Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Serum from Cattle by Dot Blot Hybridization Assay. *Veterinary Microbiology*, v. 24, n. 3-4, p. 297-306, 1990.
- 20- PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TIJSSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, v. 203, n. 2, p. 260-268, 1994.
- 21- RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; LANDGRAF, J. G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology*, v. 77, n. 1-2, p. 145-155, 2000.