

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS LEITEIROS:
UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE PAREADO E ESTRATÉGIAS DE
CONSTRUÇÃO DE MODELOS”**

GUSTAVO MACHADO

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**“VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS LEITEIROS:
UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE PAREADO E ESTRATÉGIAS DE
CONSTRUÇÃO DE MODELOS”**

Autor: Gustavo Machado

**Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na
área de Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia.**

Orientador: Prof. Luís Gustavo Corbellini

PORTO ALEGRE

2013

Gustavo Machado

VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS LEITEIROS: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE PAREADO E ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DE MODELOS

Aprovado em 05 de Março de 2013.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão

Prof. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da Comissão

Prof. Dra. Luciana Neves Nunes
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Ivone e Ademir, pela dedicação posta na minha educação, pela ajuda em construir sempre o que foi desejado, pelos incentivos a novas experiências e pelo amor dedicado em todos os momentos, ao meu irmão Tiago que mesmo que tenhamos morado longe nos últimos 10 anos sempre me inspirou e serve de exemplo de pessoa e profissional que é! “Tu é o cara meu”.

Agradecimento a todas as pessoas das quais já contribuíram para meu crescimento seja pessoal ou profissional, independente de terem tomado conhecimento disso, todas pessoas com quem já conversei de alguma forma contribuíram para que eu pudesse estar escrevendo essa dissertação de mestrado.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Luis Gustavo Corbellini, pela confiança e responsabilidade depositada em mim, pelo exemplo de competência e caráter oferecido. Aos meus colegas do EPILAB, Heber Hein, Igor Miranda, Waldemir Neto, Eduardo, Fernanda e Ana, pelo apoio e pelo conhecimento trocado durante esse período. Ao Prof. Laerte Ferreira por emprestar a sala anexa pelo primeiro ano de Mestrado, a colega Andréia e Edna pelos concelhos e amizade. Muito Obrigado.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS LEITEIROS: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE PAREADO E ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DE MODELOS.

Autor: Gustavo Machado

Orientador: Prof. Luis Gustavo Corbellini

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) causa uma das doenças mais importantes de bovinos em termos de custos econômicos e sociais, uma vez que é largamente disseminado na população de gado leiteiro. Os objetivos do trabalho foram estimar a prevalência em nível de rebanho e investigar fatores associados aos níveis de anticorpos em leite de tanque através de um estudo de caso-controle pareado, bem como discutir estratégias de construção de modelos. Para estimar a prevalência de rebanho, amostras de tanque de leite foram selecionadas aleatoriamente ($n = 314$) de uma população ($N = 1604$). A prevalência real de BVDV foi de 24,3% ($IC_{95\%} = 20,1-29,3\%$). Para o estudo de caso-controle, rebanhos positivos para BVDV (altos níveis de anticorpos) foram classificados como casos ($n = 21$) e pareados ($n = 63$) por produção de leite com rebanhos que apresentaram baixos títulos de anticorpos (razão 1:3). Para análise, três modelos multivariáveis foram construídos: 1) modelo completo, onde todas as 21 variáveis independentes foram oferecidas, e dois modelos foram criados de acordo com conhecimento empírico e similaridades entre as variáveis independentes, 2) modelo de fatores animais e 3) modelo de biossegurança. Um questionário foi aplicado ($n = 84$) para obtenção de informações a respeito de possíveis fatores de risco para BVDV. O modelo completo (Modelo 1) identificou as seguintes variáveis: idade com critério de eliminação ($OR = 0,10$; $IC_{95\%} = 0,02 - 0,39$; $P < 0,01$); propriedades que forneceram leite a outras cooperativas anteriormente ($OR = 4,13$; $IC_{95\%} = 1,17 - 14,49$; $P = 0,02$) e a presença de piquete de isolamento para animais doentes ($OR = 0,14$; $IC_{95\%} = 0,01 - 0,26$; $P = 0,02$). O modelo de biossegurança (Modelo 3) revelou uma associação significativa com o uso de monta natural ($OR = 9,03$; $IC_{95\%} = 2,14 - 38,03$; $P < 0,01$); presença de piquete de isolamento para animais doentes ($OR = 0,06$; $IC_{95\%} = 0,05 - 0,83$; $P = 0,03$); anos fornecendo leite para a mesma cooperativa ($OR = 0,94$; $IC_{95\%} = 0,91 - 0,97$; $P < 0,01$) e contato direto pela cerca entre bovinos de propriedades vizinhas ($OR = 5,78$; $IC_{95\%} = 1,41 - 23,67$; $P = 0,04$). O modelo de biossegurança pode ser considerado o “melhor”, pois obteve $AIC = 43,880$ e $BIC = 48,058$ menores quando comparado com o modelo completo que obteve $AIC = 50,445$ e $BIC = 53,779$. Esta dissertação tem a intenção de promover a discussão sobre as estratégias de construção de modelos especialmente quando se trata de saúde animal. Recomenda-se a aplicação de agrupamento de variáveis independentes como uma boa alternativa na construção de modelos, uma vez que este processo pode levar a uma melhor compreensão a respeito da associação entre cause e efeito de doenças.

Palavras-Chave: BVDV, epidemiologia, leite de tanque, fatores de risco, construção de modelos.

ABSTRACT

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) IN DAIRY CATTLE: A MATCHED CASE-CONTROL STUDY AND MODEL BUILDING STRATEGY.

Author: Gustavo Machado

Advisor: Prof. Luis Gustavo Corbellini

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) causes one of the most important diseases of cattle in terms of economic costs and welfare, since it is widespread in the dairy cattle population. The aims were to estimate herd prevalence and investigate factors associated with antibodies in bulk tank milk (BTM) in dairy herds through a matched case-control design as well as discuss model-building strategies. To estimate herd prevalence, BTM samples were randomly selected ($n = 314$) from a population ($N = 1604$). The true prevalence of BVDV was 24.3% ($CI_{95\%} = 20.1 - 29.3\%$). For the case-control study, BVDV antibody-positive herds (high antibody titers) were classified as cases ($n = 21$) and matched ($n = 63$) by milk production with herds presenting low antibody titers (ratio of 1:3). For analysis, three multivariable models were built: 1) full model, holding all 21 independent variables; and two models divided according to empirical knowledge and similarity among independent variables, i.e., 2) animal factor model and 3) biosecurity model. A questionnaire was applied ($n = 84$) to get information about possible BVDV risk factors. The full model (model 1) identified the following variables: age as a culling criteria ($OR = 0.10$; $IC_{95\%} = 0.02 - 0.39$; $P < 0.01$); farms that provided milk to other industries previously ($OR = 4.13$; $IC_{95\%} = 1.17 - 14.49$; $P = 0.02$); and isolation paddocks for ill animals ($OR = 0.14$; $IC_{95\%} = 0.01 - 0.26$; $P = 0.02$). The biosecurity model (model 3) revealed a significant association with the use of natural mating ($OR = 9.03$; $IC_{95\%} = 2.14 - 38.03$; $P < 0.01$); isolation paddocks for ill animals ($OR = 0.06$; $IC_{95\%} = 0.05 - 0.83$; $P = 0.03$); years providing milk for the same industry ($OR = 0.94$; $CI_{95\%} = 0.89 - 0.99$; $P = 0.02$); and direct contact over fences among cattle of neighboring farms ($OR = 5.78$; $IC_{95\%} = 1.41 - 23.67$; $P = 0.04$). The biosecurity model could be considered the “best” since $AIC = 43,880$ and $BIC = 48,058$ when compared with the full model where $AIC = 50,445$ and $BIC = 53,579$. This paper intends to promote discussion about the model-building strategy when animal-health-modeling is on the line. We recommend the application of grouping predictors as a good choice for model building since it could lead to a better understanding of disease-exposure associations.

Keywords: BVDV, epidemiology, bulk tank milk, risk factor, model building.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classification of 214 bulk milk samples.....	56
Tabela 2	Definition and distribution of exploratory variables.....	59
Tabela 3	Multivariable conditional logistic regression analysis.....	61
Tabela 4	Multivariable conditional logistic regression analysis of variables from subsets.....	62
Tabela 5	Best subset regression procedure conditional logistic regression.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Geographic location of the municipalities on the eastern-central region.....	57
Figura 2	Diagram of design and data collection of a cross sectional study.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Vírus da diarreia viral bovina.....	13
2.2	Infecção e doença clínica	14
2.3	Diagnóstico.....	16
2.4	Prevalência.....	19
2.5	Fatores de risco.....	20
2.6	Estudo de caso-controle	21
3	ARTIGO	25
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – Questionário epidemiológico aplicado em 84 propriedades visitadas	76
	APÊNDICE B – Análise de resíduos (marginais) do modelo completo [Full model]	83
	APÊNDICE C – Análise de resíduos (desvio) do modelo completo [Full model]	84
	APÊNDICE D – Análise de resíduos (marginais) do modelo de biossegurança [Biosecurity model]	85
	APÊNDICE E – Análise de resíduos (desvio) do modelo de biossegurança [Biosecurity model]	86

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite bovino do Brasil apresenta constante crescimento e é atualmente a sexta maior do mundo. No ano de 2009, atingiu a marca de 29,1 bilhões de litros, que corresponde a um aumento de 48% se comparado à produção de 2000, gerando uma receita de ~18,6 bilhões de reais. O Estado do Rio Grande do Sul é o segundo maior produtor, responsável por 12% do total de leite produzido no Brasil, com um rebanho de ~11,1 milhões de cabeças (6,5% bovinos leiteiros) (IBGE, 2009).

O manejo sanitário correto é essencial para o bom desempenho produtivo do rebanho, requerendo a implantação de programas bem organizados para que haja controle efetivo das doenças. No Brasil atualmente estão em vigência programas bem definidos para a bovinocultura, tais como o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose, Programa de Erradicação da Febre Aftosa e de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias, entretanto, importantes doenças que afetam a produção de leite e carne de forma substancial ainda não possuem controle sistemático. Esse é o caso do BVDV, que ainda carece de estudos epidemiológicos, principalmente na identificação e caracterização de fatores de risco associados a sua infecção.

A diarreia viral bovina é causada pelo BVDV, um vírus RNA de fita simples e envelopado pertencente ao gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* (GOYAL & RIDPATH, 2008). A infecção em bovinos de leite causa perdas econômicas significativas por diminuir o desempenho reprodutivo e a produção de leite (NISKANEN et al., 1995; GROOMS, 2006). O BVDV é capaz de estabelecer dois tipos de infecção: a transitória e a persistente. A infecção transitória pode ocorrer quando animais imunocompetentes ou normais são expostos ao vírus. Os bovinos soroconvertem e, inicialmente, apresentam altos títulos de anticorpos que vão diminuindo com o tempo, embora perdurem por toda a vida do animal (HOUE, 1999; PETERHANS et al., 2003). A infecção persistente ocorre quando vacas prenhes não imunes se infectam com o BVDV no início da gestação e, durante a viremia materna, o vírus é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto. Esse bovino, prematuramente exposto ao BVDV *in utero*, passa a reconhecer o patógeno como próprio e desenvolve imunotolerância específica ao vírus. O bezerro persistentemente

infectado (PI) pode nascer fraco ou normal e geralmente, elimina o vírus por toda a sua vida em suas secreções e excreções (MCCLURKIN et al., 1984; BROCK et al., 1998; ARENHART et al., 2009).

A infecção pelo BVDV é uma enfermidade diretamente relacionada aos problemas reprodutivos, que, conseqüentemente, implicam em perdas econômicas pelo fato da infecção ter a capacidade de ser transmitida para as próximas gerações, resultando no nascimento de bezerros PI, e afeta de forma marcante a produção leiteira (BAKER, 1995; HOUE, 1999). A soroprevalência em nível animal tem variado mundialmente entre 40 a 90% (HOUE, 1999; LINDBERG & HOUE, 2005), a prevalência de rebanhos com infecção ativa ou recentemente infectados varia de 47 a 100% (HOUE, 1994; SARRAZIN et al., 2012) e a proporção de animais PI varia de 0,1 a 2% (BROWNLIE, 1990; FREY et al., 1996; HOUE, 1999). No Brasil, tem-se demonstrado altos percentuais de soroconversão de fêmeas pelo BVDV. No Rio Grande do Sul, estudos sorológicos revelaram uma prevalência de anticorpos que varia de 10% em gado de corte e mais de 70% em gado de leite (FLORES, 2007). Vale ressaltar que a maioria dos estudos realizados no Brasil, com este objetivo, utilizaram amostras não probabilísticas, o que provavelmente afetou os resultados de estimação de prevalência e identificação de fatores de risco, esbarrando em problemas comuns nestes casos relacionados à viés e baixo poder de estimação.

O teste diagnóstico mais utilizado para BVDV é, sem dúvida o ELISA. Atualmente há um grande número de kits de ELISA indiretos disponível no mercado que são rotineiramente utilizados em países como Suíça, Finlândia e Noruega (VALLE et al., 2005). Dentre as principais vantagens do ELISA estão: rapidez na realização, relativamente mais baratos que os outros testes sorológicos disponíveis, sua repetitividade quando se trata de grande número de amostras e a possibilidade de se utilizar soro ou leite como amostra teste (NISKANEN et al., 2010).

Sabe-se que o rebanho bovino nacional está exposto ao BVDV, porém a exata prevalência e distribuição da doença através de estudos planejados, incluindo os principais fatores relacionados à presença destas enfermidades, ainda não estão totalmente esclarecidos. Para isso é importante definir o tipo de delineamento do estudo mais adequado para identificação de fatores relacionados à doença a ser estudada. Neste

sentido, é preciso caracterizar o estudo de caso-controle, o qual foi julgado como mais adequado para o estudo do BVDV. O caso-controle seleciona participantes baseado em um desfecho, é o tipo de estudo mais eficiente quando o desfecho é raro (SAINANI & POPAT, 2011). Os pesquisadores, de modo geral, selecionam e classificam os rebanhos que, por exemplo, foram positivos para BVDV como “casos” e comparam os mesmos com rebanhos que ainda não tiveram o teste positivo, porém estão expostas às mesmas circunstâncias que os casos; esse são denominados “controles” (SAINANI & POPAT, 2011). Tendo em vista a importância desse segmento no agronegócio, são necessárias pesquisas para a produção de insumos e formação de recursos humanos quanto aos métodos de diagnóstico e estudos epidemiológicos aplicados às doenças infecciosas.

Os objetivos do trabalho foram estimar a prevalência em nível de rebanho e investigar fatores associados aos níveis de anticorpos em leite de tanque através de um estudo de caso-controle pareado, bem como discutir estratégias de construção de modelos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus da diarreia viral bovina

O BVDV é o termo referido a um grupo diverso de vírus com genoma RNA de fita simples membros do gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* com dois genótipos atualmente reconhecidos através de análise filogenética: BVDV-1 e BVDV-2 (RAUE et al., 2011; STÅHL & ALENIUS, 2012). A relevância clínica e epidemiológica dessa subdivisão ainda não foi totalmente esclarecida (FLORES, 2003). Também fazem parte desta família os vírus da doença da fronteira *border disease* e o vírus da peste suína clássica. Os vírus da família *Flaviviridae* são vírus esféricos com diâmetro de 40 a 50 nm e são facilmente inativados pelo calor, detergentes, solventes orgânicos, radiação gama (RIDPATH, 2010a). As cepas de BVDV independente do genótipo estão limitadas a dois biótipos: BVDV não-citopáticas (NCP) e citopático (CP). Somente os NCP, são capazes de atravessar a placenta, invadir o feto estabelecendo infecção persistente e são considerados “verdadeiros” BVDV (FLORES et al., 2005). Os NCP representam a grande maioria das amostras de campo que estão associadas às diversas manifestações clínicas da infecção por BVDV. O biótipo CP, causa extensos danos nas células do cultivo, como vacuolização citoplasmática e destruição celular entre 48 a 72 horas, são minoria e isoladas quase que exclusivamente de animais afetados pela Doença das Mucosas (DM) (RIDPATH, 2010a). Esta diversidade antigênica entre as cepas isoladas de BVDV são importantes para epidemiologia, diagnóstico e seleção das estratégias de imunização e controle da doença (BOTTON et al., 1998). Porém, recentemente um grupo de pesquisadores da Suécia identificou um provável novo membro do gênero *Pestivirus* que causa uma síndrome que não pode ser diferenciada de BVDV apenas pelas manifestações clínicas e foi proposto que esse vírus emergente seja chamado de BVDV-3 (LIU et al., 2009). O BVDV fica caracterizado por sua diversidade e capacidade de estabelecer dois tipos principais de infecção: infecção persistente considerada a principal fonte de infecção e animais com infecção transitória que são considerados uma fonte de infecção menos importante (PETERHANS & SCHWEIZER, 2010).

2.2 Infecção e doença clínica

Basicamente existem duas formas importantes de infecção por BVDV. Primeiramente, a forma mais importante de infecção ocorre quando animais susceptíveis entram em contato com BVDV durante a gestação, quando ocorre a exposição do feto *in utero* com a cepa NCP do BVDV anteriormente ao desenvolvimento completo do sistema imune fetal, o que ocorre em torno dos 125 dias de gestação (transmissão vertical) (CASARO et al., 1971). O vírus possui tropismo por células germinativas, logo as placas de *Peyer* e o feto são os principais locais de multiplicação e durante a viremia o vírus pode atravessar a placenta e infectar o feto (GROOMS, 2004). Nestes casos, o vírus é reconhecido como próprio, e os animais nascidos vivos (fracos ou normais) podem eliminar o vírus durante toda vida, esses animais são reconhecidos como PI (MCCLURKIN et al., 1984; CASAUBON et al., 2012). Após o nascimento, esses animais não irão soroconverter e apresentarão viremia persistente (HANON et al., 2012). Animais PI geralmente são mais eficientes em transmitir o vírus do que animais denominados transitoriamente infectados (TI), pelo fato de que secretam maior quantidade de vírus e por períodos prolongados (BROCK et al., 1998). Devido ao prejuízo ao sistema imune do animal PI, esses animais são particularmente susceptíveis a outras infecções, o que, em parte, explica a alta mortalidade dos animais quando jovens em comparação à animais sadios (HOUE, 1992; 1999). Alguns animais PI podem permanecer clinicamente normais e serem selecionados para reprodução (MCCLURKIN et al., 1979) e assim retransmitir a infecção às gerações subsequentes (STÅHL & ALENIUS, 2012).

A segunda forma, menos importante, denominada TI, ocorre quando os animais imunocompetentes ficam expostos ao BVDV (transmissão horizontal). Neste caso, o BVDV é adquirido primeiramente através de aerossóis, que infecta a mucosa nasal. O contato direto focinho-focinho entre um animal infectado e um animal sadio é considerada a via mais efetiva de transmissão de BVDV horizontalmente, apesar de haver relatos de transmissão indireta pelo uso de formigas para contenção e alojamento de animais em estábulos contaminados (NISKANEN & LINDBERG, 2003). Em curto período de tempo pós infecção, animais TI fazem viremia e o vírus pode ser secretado

através das secreções e excreções por alguns dias (4-15) (MCCLURKIN et al., 1984; BROCK et al., 1998). A transmissão horizontal já foi demonstrada e pode ocorrer em apenas uma hora de contato direto como o animal PI (TRÁVÉN et al., 1991). O contato direto entre animais susceptíveis e animais PI, principalmente através da cerca, é considerada a forma mais comum de introdução da infecção em rebanhos livres (SMITH et al., 2009; STOTT et al., 2010; VOAS, 2012). É importante ressaltar que a soroconversão em rebanhos livres, ou seja, na ausência de animais PI, é um indicativo que a transmissão através de animais TI ocorreu de fato. No entanto, sua disseminação é mais lenta (MEYLING et al., 1990; MOERMAN et al., 1993).

A infecção por BVDV pode resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas, partindo de curso subclínico a sinais flutuantes e possivelmente a morte (BAKER, 1995). A maioria dos isolados de ambas as espécies (BVDV-1 e BVDV-2) apresenta baixa virulência, frequentemente com curso subclínico. Foi estimado que 70 a 90% das infecções causadas por BVDV são subclínicas (BOLIN & GROOMS, 2004). Nesta forma da doença, os animais desenvolvem apenas febre moderada e leucopenia.

As características do animal que influenciam no resultado das manifestações clínicas estão relacionadas com o estado imunológico, estágio de prenhes, idade do feto em gestação e condição de estresse imposto pelo ambiente (BAKER, 1995). A forma mais comum da doença afeta principalmente a reprodução, diminuindo o desempenho reprodutivo, aumentando taxas de retorno ao cio, malformações, aborto e pode estar acompanhada pela síndrome febre (BAKER, 1995; NISKANEN et al., 1995).

O BVDV é um dos patógenos que fazem parte do complexo de doença respiratória bovina (CDRB). A forma respiratória da doença apresenta manifestações tanto do trato respiratório superior (tosse, descarga nasal e ocular) quanto trato respiratório inferior (frequência respiratória aumentada e ausculta de sons ásperos vindo do pulmão) (RAUE et al., 2011) além de sinais gerais menos determinados afetando o sistema respiratório (NETTLETON & ENTRICAN, 1995; RIDPATH, 2010b). O desenvolvimento de sinais clínicos respiratórios é dependente de inúmeros fatores como: virulência da cepa, tipo de infecção (TI ou PI), tempo de exposição (fetal ou pós-fetal) e a presença de infecções secundárias (RIDPATH, 2010b).

A produção de leite também fica comprometida pela infecção por BVDV, principalmente por queda da imunidade e por comprometimento das defesas da glândula mamária (LAUREYNS et al., 2012). Este fato foi investigado em condições de campo e ficou provado a relação negativa que a BVDV causa na contagem de células somáticas (LAUREYNS et al., 2012).

Outra forma da doença é a aguda ou superaguda, caracterizada por hemorragias e trombocitopenia. Esta forma pode estar presente tanto em bezerros como em animais adultos e a espécie responsável por este tipo de infecção é a BVDV-2 (RIDPATH et al., 1994).

Finalmente, uma forma da doença mais agressiva, a DM, é severa e inevitavelmente fatal. Ocorre quando um animal PI se torna superinfectado por uma cepa CP derivada de uma NCP (BOLIN et al., 1985; BROWNLIE & CLARKE, 1993). A DM acomete principalmente animais de até dois anos de idade (PETERHANS et al., 2010). Na ausência de medidas de controle, foi estimada a presença de animais PI de 0,5% a 2% da população de um rebanho infectado, o que conseqüentemente leva a baixa incidência da DM, que é caracterizada por baixa taxa de ataque, porém com altas taxas de mortalidade (BROWNLIE, 1990; HOUE, 1999). Outros autores sugerem que a DM é desenvolvida quando um animal PI é infectado simultaneamente por cepas CP e NCP (CHASE, 2012). Pode-se concluir que essa forma da doença é uma consequência tardia da infecção persistente por BVDV e o diagnóstico definitivo deveria ser acompanhado por isolamento viral (BAKER, 1995).

2.3 Diagnóstico

Inúmeros métodos de identificação de animais infectados por BVDV foram desenvolvidos, incluindo isolamento viral de amostras de soro, sangue total e outros tecidos; imunofluorescência em tecidos; imunistoquímica em tecidos; ELISA realizados em amostras de soro e leite, além de inúmeras técnicas de diagnóstico molecular (DUBOVI, 2012). O isolamento viral é considerado o teste padrão ouro e recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Vale ressaltar que, independente do

teste diagnóstico, a coleta e remessa das amostras deve observar cuidados básicos que não serão abordados aqui.

O melhor método a ser utilizado é dependente da situação em que o animal ou rebanhos se encontram, depende da idade dos animais, se estão vivos ou mortos e quais os objetivos para o teste, identificar animais PI ou TI.

Dentre os testes diagnósticos mais empregados estão os sorológicos, utilizados para determinar: 1) se o animal ou rebanho entrou em contato com o vírus; 2) se um bezerro possui anticorpos colostrais; 3) se o animal ou rebanho está adequadamente imunizado; 4) se o animal ou rebanho possui uma infecção ativa; 5) se o bezerro foi infectado *in utero* (DUBOVI, 2012). Há uma diferença regional quanto à escolha do teste sorológico, nos EUA, onde a infecção e vacinação estão presentes, a soroneutralização é mais frequentemente utilizada; já na Europa o teste de ELISA é comumente utilizado (DUBOVI, 2012). No geral, o ELISA é o teste mais frequentemente utilizado para amostras de soro e/ou leite (BEAUDEAU et al., 2001a).

Para o diagnóstico de um volume grande de amostras, o ELISA é considerado mais reprodutível do que a soroneutralização e, também, economicamente mais viável (GONDA et al., 2012). Existem basicamente duas configurações de ELISA, o indireto e o direto (competitivo), os quais podem ser utilizados para detectar anticorpos em leite, plasma e soro (KATZ & HANSON, 1987; NISKANEN et al., 1991). O uso do ELISA direto tem aumentado desde os anos 90, pelo fato de que os testes até então utilizados demandavam muito tempo e pessoal treinado (KAMPA et al., 2007). O ELISA de captura NS2/3 detecta BVDV em leucócitos e amostras de tecido utilizando anticorpos monoclonais específicos contra a proteína NS2/3, e este teste tem sido utilizado com sucesso na identificação de animais PI em programas de controle de BVDV na Noruega (SYNGE et al., 1999). Ainda, foi desenvolvido um ELISA com anticorpos monoclonais contra a glicoproteína E^{ms}, que é uma proteína estrutural secretada por células infectadas durante a replicação viral e pode ser detectada diretamente no soro (KUHNE et al., 2005). Outro ELISA direto foi desenvolvido para a identificação anticorpos contra a proteína p80/NS3 que permite a diferenciação entre anticorpos vacinais e anticorpos produzidos pela infecção natural, porém vale ressaltar que animais vacinados com vacinas vivas

também desenvolvem anticorpos contra a proteína p80/NS3 (NIZA-RIBEIRO et al., 2005).

O ELISA indireto usa o BVDV por completo como antígeno para medir a resposta contra o completo espectro de proteínas imunogênicas presentes (PATON et al., 1991). Inúmeros kits comerciais de ELISA indiretos para detecção de anticorpos estão disponíveis. A adaptação da técnica de ELISA para detecção de anticorpos em amostras de leite de tanque constitui uma alternativa barata e factível na evolução dos programas de controle da BVDV em rebanhos leiteiros. O teste pode fornecer informações a respeito do *status* de um grande grupo de animais (vacas em lactação) com apenas uma amostra (EIRAS et al., 2012). Por este fato, inúmeros países da Europa vêm monitorando seus rebanhos por vários anos através de amostras de leite de tanque (BEAUDEAU et al., 2001b; RIKULA et al., 2005). Estudos recentes demonstraram que a sensibilidade do teste utilizando em amostras de tanque de leite foi capaz de identificar animais PI quase em 100% dos casos, porém a especificidade do teste foi limitada (RIKULA et al., 2005; HOUE et al., 2006). Também foi identificada alta correlação entre os níveis de anticorpos em amostras de tanque de leite detectados por ELISA indireto e a prevalência de BVDV em amostras de soro de vacas positivas (NISKANEN et al., 1991).

Para o diagnóstico de BVDV em rebanhos, inicialmente o *spot test* permitiu a identificação de rebanhos infectados dispensando a necessidade de coleta de 100% dos animais. A detecção de anticorpos contra BVDV no *spot test*, que é direcionado para animais jovens (animais de 8 a 18 meses), é um indicativo da presença de infecção corrente (HOUE, 1994), no entanto, é muito mais laborioso se comparado com o teste em amostras de tanque de leite.

Basicamente, quando se tratar de um rebanho livre de BVDV, a maioria do rebanho provavelmente se apresentará soronegativo, com isso o resultado do ELISA resultará em níveis baixos ou indetectáveis de anticorpos (JUNTTI et al., 1987; NISKANEN, 1993). A ausência de anticorpos indica que o rebanho está livre da doença (PATON et al., 1998). A principal vantagem da amostragem de tanque de leite é a facilidade e o baixo custo associado, facilitando a logística dos estudos assim como diminui os riscos de acidentes associados à coleta de soro.

2.4 Prevalência

O BVD é endêmico na maioria dos países, a prevalência pode ser expressa em níveis de anticorpos e ou na presença de animais PI. Em todos os países onde dados de prevalência em nível de rebanho estão disponíveis, a média fica em torno de 55% de rebanhos positivos (HOUE, 1995). A soroprevalência em nível animal tem variado de 60 a 90% (HOUE, 1999; LINDBERG & HOUE, 2005) e a proporção de animais PI de 0,1 a 2% (BROWNLIE, 1990; FREY et al., 1996; HOUE, 1999). A prevalência de rebanhos com infecção ativa, ou recentemente infectados, varia de 70 a 100% (HOUE, 1994). Entretanto, há algumas diferenças entre regiões e países, o que pode estar relacionado com diferenças em densidade animal, instalações, vacinação, sistemas de manejo e principalmente a presença de animais PI (HOUE, 1999). Um estudo em amostras de leite na Suíça identificou a presença de anticorpos em 83,7% dos rebanhos e 45,5% com infecção ativa ou recente causada por BVDV (NISKANEN, 1993). Em outros países, como no Irã, a prevalência de rebanhos foi de 94% e 52,5% de infecções ativas ou recentes (GAROUSSI et al., 2008); no Peru foram identificados níveis maiores (95%) de rebanhos positivos (STÅHL et al., 2008). Na Tailândia, níveis de infecção menores foram encontrados: 73% em nível de rebanho e uma proporção de infecção ativa ou recente de 13% (KAMPA et al., 2004). Mais recentemente, um estudo na Bélgica identificou 47,4% de rebanhos com anticorpos positivos e a presença de 4,4% de antígenos específicos para BVDV; já em nível animal foram 32,9% de positivos para presença de anticorpos e apenas 0,3% dos animais positivos para a presença de antígenos de BVDV, sendo que dos 44,4% dos rebanhos positivos, aproximadamente 60% dos animais amostrados eram jovens (SARRAZIN et al., 2012). Outro estudo realizado em amostras de tanque de leite realizado na Escócia identificou níveis de anticorpos de acordo com os padrões Suecos de 12,7, 22,3 44,5 e 20,5%, que são classificam em nível crescente pela presença de anticorpos de 0 a 3, respectivamente. Porém um achado importante foi que 73% dos rebanhos possuíam níveis elevados de anticorpos sugerindo infecção ativa ou introdução recente da infecção (HUMPHRY et al., 2012).

No Brasil, os estudos realizados revelam que a doença está amplamente disseminada nos rebanhos, apesar do baixo poder analítico dos estudos, principalmente

pela falha na seleção dos animais e/ou rebanhos a serem analisados (DIAS & SAMARA, 2003; FLORES et al., 2005; CHAVES et al., 2010; STURZA et al., 2011). Porém, a prevalência estimada através de estudos com clara descrição da amostra demonstram índices de BVDV variando de 68 a 90% (POLETTTO et al., 2004; THOMPSON et al., 2006; QUINCOZES et al., 2007). Em países da América Latina, como Uruguai e Chile, a prevalência variou de 77,8 a 69% (REINHARDT et al., 1990; GUARINO et al., 2008).

2.5 Fatores de risco

O termo “Fator de Risco” é usado para fatos ou circunstâncias associadas ao aumento da probabilidade de um evento ocorrer (infecção por BVDV, por exemplo). Fatores de risco podem ser identificados em qualquer nível, seja em nível de rebanhos, regiões ou até mesmo países por completo. Particularmente para BVDV, é desejável a identificação de riscos em nível de rebanho. Naturalmente os estudos de fatores de risco variam de acordo com o delineamento dos estudos, por isso deve-se ter cuidado com generalizações dos achados.

Fatores associados com infecção por BVDV, já identificados, foram principalmente: tamanho de rebanho; distância de propriedades vizinhas com criação de bovinos; número de vizinhos com rebanhos infectados; compra de animais sem teste negativo para BVDV; pastejo de várias categorias animais no mesmo piquete; contato direto entre animais de vizinhos (cerca-cerca); não possuir assistência técnica; estar em área de alta prevalência de BVDV; vacinação para BVDV; alojamento de fêmeas prenhas com bezerros; proporção de vacas secas no rebanho. Outros fatores já foram especulados como potenciais fatores de risco, porém não foram totalmente elucidados: ovinos e bovinos pastejando em mesmo piquete; queda de cerca; reutilização de agulhas pelo Médico Veterinário; presença de animais selvagens em pastejo com bovinos; presença de árvores nos piquetes dos bezerros; origem da água fornecida aos animais; monitoramento de abortos; entre outros (HOUE, 1999; VALLE et al., 1999; LUZZAGO et al., 2008; TALAFHA et al., 2009; HUMPHRY et al., 2012; SARRAZIN et al., 2012).

2.6 Estudo de caso-controle

Estudos de caso-controle são frequentemente utilizados em epidemiologia veterinária e humana. A eficiência em relação ao tempo e custo aplicados neste tipo de estudo o torna atrativo quando: se trata de doenças raras, de baixa prevalência (WENG & MESSAM, 2012), doenças com período de latência ou incubação prolongados (SONNENSCHNEIN et al., 1991; BARTLETT et al., 2010), quando o acesso ao diagnóstico final ou identificação de doentes é onerosa financeiramente (GOTTER et al., 2012) ou quando é necessária rápida resposta (investigação de epidemias) (EPP et al., 2010; FIRESTONE et al., 2011).

Em epidemiologia, os estudos observacionais mais frequentemente realizados são estudos de coorte e caso-controle (WENG & MESSAM, 2012). Em estudos de coorte, os pesquisadores acompanham um grupo de animais em risco para o acompanhamento do desfecho de interesse durante um período de tempo predeterminado (MELLOR & LOVE, 1998; ROTHMAN et al., 2008). O termo “em risco” indica que os membros deste grupo estão livres dos desfechos em questão, mas há possibilidade de desenvolvimento do mesmo (WENG & MESSAM, 2012). O processo de acompanhamento do grupo pode ser prospectivo, retrospectivo ou bidirecional, desde que seja acompanhado longitudinalmente (WENG & MESSAM, 2012).

Genericamente estudo de caso-controle inclui todos os indivíduos dentro de um grupo que supostamente adquiriram a doença em estudo (casos de BVDV, por exemplo) durante um período de tempo específico e uma amostra aleatória de indivíduos que estiveram sob risco de desenvolver a doença (controles de BVDV, por exemplo) durante o mesmo período de tempo ou momento especificado (ROTHMAN et al., 2008).

Estudo de caso-controle é um tipo de estudo alternativo mais eficiente em comparação ao estudo de coorte (ROTHMAN et al., 2008). A diferença mais importante entre caso-controle e coorte é que estudo de caso-controle envolve amostragem, particularmente amostragem dos controles (MELLOR & LOVE, 1998; THRUSFIELD, 2007).

Assumimos que os estudos de caso-controle são visto como uma alternativa eficiente aos estudos de coorte. Um objetivo na condução do estudo é estimar medidas de

efeito que normalmente seriam estimadas em estudos de coorte (WENG & MESSAM, 2012). As medidas de efeito (força de associação) comumente usadas em estudos epidemiológicos são: risco relativo e *odds ratio* (OR) (ROTHMAN et al., 2008; DOHOO et al., 2009). O OR é a probabilidade da doença no grupo exposto dividido pela probabilidade da doença no grupo não exposto (DOHOO et al., 2009).

Para a seleção dos casos, teoricamente todos os casos presentes em uma determinada população podem ser candidatos potenciais se adequadamente cumprirem os requisitos pré-estabelecidos pelo estudo. No entanto, o que comumente ocorre por questões práticas somente uma amostra do total de casos são selecionados (SCHULZ & GRIMES, 2002). É importante que a forma de seleção dos casos seja detalhada pelo pesquisador a fim de definir claramente o que se pretende estudar, por exemplo: resultados de diagnóstico, sinais clínicos, achados de necropsia e assim por diante (SCHULZ & GRIMES, 2002). Os pesquisadores devem detalhar todos os critérios de seleção para a elegibilidade dos casos como: variação de idade, área de estudo (hospital, cooperativa) (SCHULZ & GRIMES, 2002).

A seleção dos controles deve basicamente estar baseada na não presença da doença (desfecho), mas devem ser representativos daqueles indivíduos que poderiam ser selecionados como casos, caso esses tivessem desenvolvido a doença, sinais clínicos e assim por diante (SCHULZ & GRIMES, 2002). Em outras palavras, os controles devem representar a população em risco de se tornarem casos. No processo de seleção dos casos e controles o investigador precisa estar atento aos riscos da inclusão de viés, para isso algumas estratégias devem ser observadas. Por exemplo, se o grupo dos casos incluem todos os indivíduos afetados em uma região geográfica específica, os controles devem ser escolhidos aleatoriamente da mesma região geográfica da população de casos (SCHULZ & GRIMES, 2002). Os leitores são recomendados a não aceitar estudos de caso-controle sem antes verificar como os controles foram escolhidos, recomenda-se verificar se os controles representam adequadamente os casos independentemente da doença em estudo, e com isso diminuiu as chances de inclusão de viés (SCHLESSELMAN & STOLLEY, 1982).

Um tipo de viés que deve se tomar cuidado é o viés de confundimento (GRIMES & SCHULZ, 2002). Este tipo de problema pode ser amenizado na fase de delineamento

do estudo através de restrições ou por pareamento, mas a maioria dos pesquisadores optam por resolver isso na fase de análise através de regressão logística ou estratificação com a abordagem de *Mantel-Haenszel* (ROTHMAN et al., 2008). Quando as variáveis usadas para o pareamento forem categóricas ou discretas, o uso de pareamento não é considerado efetivo para o controle de adição de viés (SCHLESSELMAN & STOLLEY, 1982).

Portanto, medidas inválidas por potenciais fatores de confundimento levam à resultados viesados, o que pode limitar ou até mesmo comprometer os resultados obtidos (SCHULZ & GRIMES, 2002). Independentemente da análise utilizada, os pesquisadores não são capazes de controlar uma variável que não se tem dados para tal (SCHULZ & GRIMES, 2002).

Uma solução muito usada para redução do confundimento é o pareamento baseado em variável(eis) identificada(s) ou suspeita(s) de ser(em) potencial(ais) confundidor(es) (ROSE & LAAN, 2009), porém outros autores apontam o pareamento como meio de aumentar a eficiência do estudo por forçarem que as amostras de casos e controles tenham uma distribuição semelhante com a presença do confundidor (ROSE & LAAN, 2009). O pareamento possui uma desvantagem, exige maior capacidade computacional para a análise (Regressão logística condicional). Uma análise que ignore o pareamento irá resultar em OR viesados (SCHLESSELMAN & STOLLEY, 1982).

As desvantagens do pareamento estão atreladas às dificuldades no pareamento, o valor financeiro associado e o tempo dispendido para encontrar o pareamento adequado (SCHLESSELMAN & STOLLEY, 1982).

A regressão logística para estudos de caso-controle pareados diferem dos estudos não pareados, pois a primeira permite que o intercepto varie entre as unidades pareadas dos casos controles (ROSE & LAAN, 2009). É importante ressaltar que a variável usada no pareamento (variável que controla o confundimento) não é incluída no modelo (BRESLOW et al., 1978; SCHLESSELMAN & STOLLEY, 1982). Uma forma de regressão logística especial é necessária para a análise de estudos pareados (regressão logística condicional). A regressão logística condicional é uma importante extensão dos modelos de regressão logística, permitindo a análise de dados pareados. Como outros

modelos de regressão, a regressão logística condicional também permite a construção de modelos multivariáveis (GOODMAN & LI, 2012).

3 ARTIGO

ARTIGO A SER SUBMETIDO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA
“PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE”

**A formatação do artigo segue as normas da revista “Preventive Veterinary
Medicine”**

1 **Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy cattle: a matched case-control study**
2 **and model-building strategy**

3

4 G. Machado^a, R.M.F. Egocheaga^b, H.E. Hein^a, I.C.S. Miranda^a, W.S. Neto^a, L.L.
5 Almeida^b, C.W. Canal^b, M.C. Stein^c, L.G Corbellini^{a*}

6

7 **ABSTRACT**

8 Bovine viral diarrhea virus (BVDV) causes one of the most important diseases of cattle in
9 terms of economic costs and welfare, since it is widespread in the dairy cattle population.
10 The aims were to estimate herd prevalence and investigate factors associated with
11 antibodies in bulk tank milk (BTM) in dairy herds through a matched case-control design
12 as well as discuss model-building strategies. To estimate herd prevalence, BTM samples
13 were randomly selected (n = 314) from a population (N = 1604). The true prevalence of
14 BVDV was 24.3% (CI_{95%} = 20.1 - 29.3%). For the case-control study, BVDV antibody-
15 positive herds (high antibody titers) were classified as cases (n = 21) and matched (n =
16 63) by milk production with herds presenting low antibody titers (ratio of 1:3). For

^a Laboratório de Epidemiologia Veterinária (EPILAB), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, Brazil- * Corresponding author: Luís Gustavo Corbellini- Phone: +55 51 3308 6123 Fax: +55 51 3308 7305 E-mail address: luis.corbellini@ufrgs.br (L.G.Corbellini).

^b Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil.

17 analysis, three multivariable models were built: 1) full model, holding all 21 independent
18 variables; and two models divided according to empirical knowledge and similarity
19 among independent variables, i.e., 2) animal factor model; and 3) biosecurity model. A
20 questionnaire was applied (n = 84) to get information about possible BVDV risk factors.
21 The full model (model 1) identified the following variables: age as a culling criteria (OR
22 = 0.10; IC_{95%} = 0.02 – 0.39; P < 0.01); farms that provided milk to other industries
23 previously (OR = 4.13; IC_{95%} = 1.17 – 14.49; P = 0.02); and isolation paddocks for ill
24 animals (OR = 0.14; IC_{95%} = 0.01 – 0.26; P = 0.02). The biosecurity model (model 3)
25 revealed a significant association with the use of natural mating (OR = 9.03; IC_{95%} = 2.14
26 – 38.03; P < 0.01); isolation paddocks for ill animals (OR = 0.06; IC_{95%} = 0.05 – 0.83; P =
27 0.03); years providing milk for the same industry (OR = 0.94; CI_{95%} = 0.91 - 0.97; P =
28 0.02); and direct contact over fences among cattle of neighboring farms (OR = 5.78;
29 CI_{95%} = 1.41 - 23.67; P = 0.04). The biosecurity model could be considered the “best”
30 since AIC = 43,880 and BIC = 48,058 when compared with the full model where AIC =
31 50,445 and BIC = 53,579. This paper intends to promote discussion about the model-
32 building strategy when animal-health-modeling is on the line. We recommend the
33 application of grouping predictors as a good choice for model building since it could lead
34 to a better understanding of disease-exposure associations.

35 Keywords: BVDV; epidemiology; bulk tank milk; risk factor; model building.

36

37 **1. Introduction**

38 Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is one of the most common and economically
39 important viruses of cattle (Houe, 1999). Infections are endemic worldwide and result in

40 major losses primarily due to negative effects on reproduction, general health condition,
41 and indirect market-related issues (Baker, 1995; Houe, 2003; Al-Afaletq et al., 2007; Eiras
42 et al., 2012; Ståhl and Alenius, 2012). Maintenance of BVDV within cattle herds and
43 transmission to susceptible hosts commonly takes place as a result of exposure to
44 persistently infected (PI) cattle that harbor and shed the virus throughout their life
45 (Brownlie et al., 1987). After infection of immunocompetent hosts, an antibody response
46 follows that can last for many years and can be detected in sera or milk (Houe, 1995).

47 Several BVDV control strategies have been proposed and launched in many
48 countries, which are always based on information about prevalence and incidence, which
49 is the baseline knowledge for designing and implementing effective regional or wider
50 control actions (Niza-Ribeiro et al., 2005). Among the benefits of estimating herd
51 prevalence are monitoring progress of the infection, insights for better decision making,
52 and the design of health plans (Humphry et al., 2012). Currently, some countries are
53 running BVDV eradication programs (Sandvik, 2004; Ridpath, 2010), and others have
54 successfully eradicated the disease (Houe et al., 2006; Presi et al., 2011). To estimate the
55 prevalence of BVDV antibodies, ELISA is the most frequently used diagnostic technique
56 in serum and/or milk samples (Beaudeau et al., 2001; Eiras et al., 2012). Detection of
57 antibodies from bulk tank milk (BTM) is considered an inexpensive and reliable
58 alternative for monitoring the disease that in turn can be applied for control strategies
59 within dairy herds, as the test can provide information about the status of a large group of
60 animals (lactating cows) or individual milk samples (Beaudeau et al., 2001; Ståhl et al.,
61 2002). Commercial ELISA tests currently used in BTM have almost equal sensitivity
62 (81%) and specificity (91%) compared to the ones applied in serum and have the

63 advantage that the sampling method is less invasive, faster, and easier to perform in large
64 herds (Thobokwe et al., 2004).

65 Many studies have estimated dairy and beef herd prevalence around the world
66 (Paton et al., 1998; Ståhl et al., 2002; Thobokwe et al., 2004; Garoussi et al., 2008;
67 Brülisauer et al., 2010), and its well known that BVDV is also spread within Brazilian
68 herds (Canal et al., 1998; Chaves et al., 2010). However, most studies previously
69 conducted in Brazil used non-probabilistic samples many have introduced bias into the
70 prevalence and odds estimated (Dias and Samara, 2003; Flores et al., 2005; Chaves et al.,
71 2010; Sturza et al., 2011).

72 A number of studies have been done on BVDV risk factors (Valle et al., 1999;
73 Solis-Calderon et al., 2005; Presi et al., 2011; Humphry et al., 2012; Rodrigo Saa et al.,
74 2012; Sarrazin et al., 2012). The knowledge and information about major risk factors are
75 related to the following: biosecurity (Humphry et al., 2012), reproduction management
76 (Houe, 1999; Gard et al., 2007; Quincozes et al., 2007; Chaves et al., 2010; Humphry et
77 al., 2012), herd size (Presi et al., 2011; Sarrazin et al., 2012), animal introduction (Houe,
78 1999; Valle et al., 1999; Luzzago et al., 2008; Presi et al., 2011), direct contact with other
79 animals (from the same species or not) (Lindberg and Alenius, 1999; Valle et al., 1999;
80 Luzzago et al., 2008), communal grazing (Valle et al., 1999; Rossmannith et al., 2005;
81 Presi et al., 2011), or age of animals (Mainar-Jaime et al., 2001; Presi et al., 2011). But,
82 to the authors' knowledge, only a few case-control studies have been performed to access
83 BVDV risk factors (Valle et al., 1999; Kadohira and Tajima, 2010), and only one
84 matched case-control study has been described (Valle et al., 1999). A matched case-
85 control study increases efficiency (i.e., power of the study) and leads to a balanced

86 number of cases and controls across the levels of the selected matching variable(s) (Rose
87 and Laan, 2009). This balance can reduce the variance in the parameters of interest,
88 which improves statistical efficiency. However, increases in efficiency with a matched
89 design heavily depend on the selection of a confounding variable as a matching variable
90 (Rose and Laan, 2009).

91 Adequate reporting of the predictor selection methods used is important because
92 the number of candidate predictors and how they are selected at various stages of the
93 study can both influence the specific predictors included in the final multivariable model
94 and thus affect the interpretation of the results (Sun et al., 1996; Steyerberg et al., 2001).
95 Multivariable models provide the user with a valuable insight into the relative importance
96 of a group of prediction variables. Much has been written on the most appropriate way to
97 conduct a multivariable model with the majority of the authors concluding that there is no
98 established “best” way to build a model, as circumstances differ with sample size, amount
99 of variables, and type of data (Harrell et al., 1996).

100 In this article, we studied relevant aspects about BVDV-associated factors
101 concerning: animal characteristics, herd management, environmental conditions, and
102 agro-economic issues. For this, a case-control study was performed by matching milk
103 production as a proxy of herd size (Rose and Laan, 2009), that was previously identified
104 as confounder (Solis-Calderon et al., 2005). The aims of the present study were to
105 estimate the herd prevalence by a cross-sectional study and investigate risk factors
106 associated with BVDV using a matched case-control design as well as to discuss model-
107 building strategies.

108 **Material and methods**

109 *2.1 Study area and target population*

110 Rio Grande do Sul is the southernmost state of Brazil (Fig. 1), and has a total area
111 of 268,781.896 km² and 497 municipalities. The cattle population is about 13.5 million of
112 which 10% are dairy cattle (IBGE, 2010). It is the second largest milk-producing state, in
113 which milk production is clustered in six well-defined regions (Zoccal et al., 2006).

114 The present study was performed in a cooperative of milk producers located in the
115 eastern-central region (Fig. 1) of Rio Grande do Sul. The cooperative's farms are
116 distributed in 46 municipalities that cover 1.7% (4728 km²) of the state area. The region
117 has 14,957 farms and 175,175 dairy cattle with a medium herd-size of nine bovines
118 (SEAPA-RS). It is one of the main dairy-producing regions, and animals are raised
119 mostly on small farms (mean of 10 ha) that produce an average of 2460 L/cow/year
120 (Zoccal et al., 2006).

121 The target population was dairy herds that pertain to the cooperative, which
122 consists of 1603 herds and a total of 31,467 bovines (Fig. 2). It encompasses 12.92% of
123 the cattle from the 46 municipalities covered by the cooperative. The cooperative was
124 chosen for convenience (i.e., close to the Faculty of Veterinary) and because it represents
125 the general management and herd size of milk production in the state of Rio Grande do
126 Sul.

127 Approximately 79% of the farms have up to 31 hectares, and 70% have up to 84
128 animals. The median herd-size and number of lactating cows are 17 and six, respectively,
129 and the average milk production is 17 L/cow/day. The milk-production system is semi-
130 intensive; the animals are fed a concentrated diet of corn silage and mineral salts in
131 fenced pastures. Most of the cows belong to the Holstein breed and the replacement rate

132 varies between 20 to 25% per year. Heifers are bought from neighbors or breeders from
133 other regions of the state. Cattle herds are vaccinated against foot-and-mouth disease and
134 brucellosis. There is no specific BVDV control plan, and owners of herds with abortion
135 outbreaks are advised to use a polyvalent vaccine for important abortifacient and
136 respiratory diseases, such as that caused by BVDV, bovine herpesvirus, parainfluenza
137 virus type 3, bovine respiratory syncytial virus and prevalent *Leptospira* species. Milk is
138 kept in bulk tanks or refrigerated cans.

139 2.2. *Survey design and sample collection*

140 First, a cross-sectional survey was performed to estimate the seroprevalence of
141 BVDV in the target population, and then based on the serological results and milk
142 production a matched case-control design was done in order to check for risk factors
143 associated with BVDV. The sample size for the prevalence estimate was calculated using
144 R (Package EpiCalc) (Thrusfield, 2007), considering the following values: 1604 dairy
145 herds, 43% expected prevalence (Almeida et al., 2013), 95% confidence interval, and 5%
146 of absolute precision. The minimum sample-size required was 300 dairy herds but 314
147 samples were selected through simple random sampling from the sampling frame
148 provided by the cooperative (Fig. 2).

149 Since a low number of positive herds were found in the prevalence study (3.50% -
150 11/314 with moderate or high antibody titers), all remaining herds with milk production
151 higher than 10,000 L/month were collected (n = 152 dairy herds). This target sampling
152 (convenient) was done in order to increase the number of herds with high antibody titers
153 to be included as case herds and was based on a study in a similar region that identified
154 herds with ≥ 40 bovines per herd tended to be more likely to be positive by ELISA

155 (Almeida et al., 2013). Although the final number of herds collected was 466, only the
156 314 randomly selected herds were considered for the prevalence estimation.

157 The case-control study was planned considering all the herds tested by ELISA (n
158 = 466) that resulted in 21 case herds with high antibody titers that were matched with 63
159 random control sets with low or very low antibody titers that were matched by milk
160 production (proxy of herd size). Each set contained three control herds (case-control ratio
161 $m:n - 1:3$).

162 *2.3 Bulk tank milk collection*

163 BTM samples of 12 mL from the selected herds were isolated from the milk
164 aliquots routinely collected from every producer and submitted to the cooperative's
165 laboratory for quality control analysis. During sampling and transportation, raw milk was
166 kept under refrigeration between 2 and 8°C without preservatives. Following an
167 overnight rest, a 1.2 mL sample of skim milk was collected and kept at -20°C until
168 analysis.

169 *2.4 Serological assay and interpretation*

170 A commercial indirect ELISA kit (SVANOVIR™ BVDV-Ab kit, SVANOVA
171 Biotech, Uppsala, Sweden) was used for BVDV antibody detection in BTM. The BTM
172 samples were incubated overnight at 4 - 8°C in plates coated with viral antigen (100 µL
173 skim milk/well) according to the manufacturer's instructions. The absorbance at a single
174 wavelength of 450 nm (A_{450}) was determined using a spectrophotometer (Asys Expert
175 Plus, Asys Hitech GmbH, Austria). The optical density A_{450} values (OD) were corrected
176 using the following formula: $OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative control}} = \text{corrected optical density (COD)}$.

177 For the herd prevalence, the results from the analysis of BVDV antibodies in

178 BTM were interpreted according to the Swedish BVDV control scheme, which classifies
179 the herds into four different classes based on COD (Niskanen, 1993; Lindberg and
180 Alenius, 1999): class 0 herds are BVDV antibody-negative and probably free of infection
181 (COD < 0.05); class 1 herds have a low or very low antibody titers in the BTM (COD
182 0.05 - 0.249); class 2 herds (COD 0.25 - 0.549) and class 3 herds (COD \geq 0.55) have a
183 moderate or high antibody titer, with an estimated within-herd prevalence among class 3
184 herds of 87% (Niskanen, 1993). The proportion of herds in classes 1 to 3 was used to
185 estimate the prevalence of antibody-positive herds (Ståhl et al., 2002; Ståhl et al., 2008).

186 2.5. *Selection of cases and controls*

187 Dairy herds represented by their BTM ELISA results were the unit of interest for
188 this study. Considering the low number of positive herds for BVDV (n = 21), farms were
189 included in the case group if they were classified in BTM class 2 or class 3 because both
190 classes suggest current or recent BVDV infections (Niskanen, 1993; Lindberg and
191 Alenius, 1999). Controls were selected at random from the remaining negative herds (n =
192 445) that tested as class 0 or 1; both classes suggest a low or very low antibody titer in the
193 BTM.

194 2.6 *Questionnaire and interview*

195 The questionnaire was designed to gather information about potential risk factors
196 associated with BVDV transmission and/or its maintenance within a herd. The
197 questionnaire was developed in consultation with experts' knowledge on BVDV and
198 based on previous studies. All case-control selected herds (n = 84) were visited for
199 collecting information from August 2011 to September 2011. Particular regional
200 vocabulary was considered in the question structure. The structured questionnaire had 41

201 "close-ended" questions grouped into five main categories: general farm characteristics;
202 biosecurity; reproductive management; farm sanitary conditions; and general
203 management and farm facilities structure. It was previously tested in five non-
204 participating farmers to identify potential sources of misinterpretation and to further
205 refine the questions. Three graduate students were trained to perform the interviews. Each
206 personal interview lasted 15 - 30 min; owners/managers. The interviews were performed
207 by blind face-to-face procedure. The questionnaire was evaluated by the Ethics
208 Committee of Animal Use of the current University and is registered under project
209 number: 20710. A copy is made available from the corresponding author upon request.

210 *2.7 Statistical analysis*

211 Analyses were done using R (Package EpiCalc), SAS 9.2 (Institute Inc., Cary,
212 NC, USA).

213 For the prevalence, positive herds included herds from classes 1 to 3 (i.e., COD
214 values ≥ 0.05). Herd-level sensitivity (Se) of 85% and a specificity (Sp) of 97%
215 (Niskanen, 1993; Ståhl et al., 2002) were used to adjust the apparent prevalence (AP)
216 using the equation for the true prevalence (TP) = $(AP + Sp - 1) / (Se + Sp - 1)$ (Thrusfield,
217 2007). A 95% confidence interval (CI) for the prevalence was based on the normal
218 approximation of the binomial distribution.

219 For the matched case-control analysis a conditional logistic regression for paired
220 samples, as suggested by (Hosmer and Lemeshow, 2000), was used to assess possible
221 associations between cases and the explanatory variables. Conditional logistic regression
222 is recommended to investigate the relationship between an outcome and a set of factors in
223 matched case-control studies. The PROC PHREG procedure (SAS) for $m:n$ matching was

224 used, in which a stratum (i.e., milk production) for each matched set was formed. The
225 outcome was BVDV positive (case) coded as 1 and BVDV negative (control) coded as 2
226 (variable status). A dummy survival-time was created, so that all the cases in a matched
227 set have the same event-time in value, and the corresponding controls are censored at a
228 later time (variable censor). Cases censor had a value of 1 and controls a value of 0. Odds
229 Ratio (OR) was adjusted for the stratification in the data and intending to minimize the
230 issue of the small number of cases, in comparison to the amount of variables, we used the
231 robust sandwich variance estimate proposed by Lin and Wei (1989), which is already
232 implemented in SAS. Linearity of the significant variables was tested by categorizing
233 continuous ones into tree category variables.

234 Variables were first screened based on response rates and frequencies of the
235 responses. Variables with large amounts of missing data ($> 10\%$) and limited variability
236 ($< 20\%$) were not included in the multivariable model. The remaining variables were
237 entered individually into a univariable conditional logistic regression model and selected
238 for inclusion in the multivariable model if $P < 0.25$. Subsequently, all the screened
239 variables were submitted to correlation analysis. If any correlation was found to be > 0.7 ,
240 the variable with the lowest P -value was included to the multivariable model; two
241 variables were excluded to avoid multicollinearity. Interactions between all pairwise
242 variables suitable for the final model were examined and if significant ($P < 0.05$) were
243 taken up for further analysis. Subsequently, selected variables ($n = 21$) were included to
244 the multivariable model in three ways as follows: 1) full model, that hold all 21
245 independent variables; and two models divided according to empirical knowledge and
246 similarity among independent variables, i.e., 2) animal factor model (subset of variables

247 related to animal characteristics); and 3) biosecurity model (subset of variables related to
248 farm/management biosecurity). For data exploration, an automated selection procedure
249 was done and compared with the manual procedure using automatic best subsets
250 regression selection on SAS using the Furnival and Wilson (1974) algorithm.

251 Multivariable models were built in a manual forward method, each remaining
252 variable was added to the best previous model, selected by the Akaike Information
253 Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC), since Hosmer-Lemeshow
254 goodness-of-fit test is inappropriate for conditional logistic regression models (Fasina et
255 al., 2012). A backwards elimination step was finally used, resulting in a final model in
256 which only variables with $P < 0.05$ were retained. Confounding effects were investigated
257 by checking changes in the point estimates of the variables that remained in the model.
258 Changes in parameter estimates $> 25\%$ were considered as a confounder. The goodness-
259 of-fit of the final model was tested using *Pseudo R*² (Dohoo et al., 2009).

260

261 3. Results

262 Overall there were 75 BTM BVDV antibody-positive herds out of 314 sampled
263 for the prevalence estimate (23.9%). The frequency of positive samples according to
264 COD classes is shown in Table 1. The true prevalence of BVDV was 24.3% (CI_{95%} =
265 20.1% - 29.3%). Approximately 96% of the herd's BTM had COD values less than 0.25.
266 Herds within class 2 and 3 were more likely to produce ≥ 10000 L/month/herd ($\chi^2 =$
267 65.12; $P < 0.001$).

268 The overall model was based on 84 data points, with 21 cases and 63 controls (21
269 matched groups $m:n$). The milk production varied from 203 to 74,512 L/month/herd; the

270 size of the farms was from 1.58 to 77.5 ha. The model using selected cases matched with
271 a set of randomly selected controls identified candidate variables to the multivariable
272 model associated with BVDV seropositivity, either as protective or risk factors (Table 2).
273 From the 84 farms included, 42 (50%) had vaccinated some animals (could not specify
274 which category) with a polyvalent vaccine that includes BVDV (inactivated vaccine)
275 within the past two years (12 cases and 30 controls). This variable was analyzed in the
276 conditional logistic regression and no significant association (OR: 1.59; 0.52 - 4.82; $P =$
277 0.40) was found. Variables remaining for analysis after the univariable step were entered
278 into the multivariable model (Table 2). There were five variables with limited variability
279 and one with a large amount of missing data. Two independent variables with correlation
280 coefficient > 0.7 were excluded from the analysis. The full model identified the following
281 variables associated with BVDV serological status (Table 3): age as a culling criteria (OR
282 = 0.10; $IC_{95\%} = 0.02 - 0.39$; $P < 0.01$); farms that provided milk to other industries
283 previously (OR = 4.13; $IC_{95\%} = 1.17 - 14.49$; $P = 0.02$); and isolation paddocks for ill
284 animals (OR = 0.14; $IC_{95\%} = 0.01 - 0.26$; $P = 0.02$). None of the two-way interaction
285 terms were significant at $\alpha 5\%$ and the only confounding factor identified was used as
286 matching variable (milk production). The model goodness-of-fit (*Pseudo R*²) accounted
287 for 16.44% of the proportion of the total variability of the outcome that is accounted by
288 the model.

289 Results of the final multivariable model for the two subsets of variables
290 according to empirical knowledge were (Table 4): 2) the animal factor model was found
291 to have no significant associations; 3) the biosecurity model revealed significant
292 association with the use of natural mating (OR = 9.03; $IC_{95\%} = 2.14 - 38.03$; $P < 0.01$),

293 isolation paddocks for ill animals (OR = 0.06; IC_{95%} = 0.05 – 0.83; P = 0.03), years
294 providing milk for the same industry (OR = 0.94; CI_{95%} = 0.91 - 0.97; P = 0.02), and
295 direct contact over fences among cattle of neighboring farms (OR = 5.78; CI_{95%} = 1.41 -
296 23.67; P = 0.04). The model goodness-of-fit (*Pseudo R*²) accounted for almost a quarter
297 (22.23%) of the variability in the data.

298 Finally, results of the automatic best subset regression procedure are shown in
299 Table 5. For the full model, all variables except for isolation paddocks for ill animals
300 were the same as the manual selection procedure, while for the biosecurity model; all
301 variables selected were also selected on the manual model.

302

303 **4. Discussion**

304 A true prevalence of 24.3% of BVDV-positive herds was found and only a small
305 amount (1.3%) had high antibody titers suggestive of current or recent BVDV infection.
306 This prevalence level based on the BTM samples shown to be much lower than expected
307 based on studies made in regions without former BVDV control (Table 1). What should
308 be highlighted here is the fact that there is a lack of epidemiological studies using ELISA
309 on BTM samples in Brazil. One study done in Brazil estimated prevalence of positive
310 milk in individual cows varying from 5.26 to 70.83% between different farms (Dias and
311 Samara, 2003), but no herd-level studies using ELISA on BTM have been done. In
312 Finland, a very low prevalence of positive herds was also found, which was probably
313 related to the low cattle and herd-density in that country (Niskanen, 1993). Another study
314 that used the same ELISA as ours revealed a moderate level of exposure to BVDV (73%)
315 and a lower proportion (13%) of herds with high BVDV antibody titers (Kampa et al.,

316 2004). It has also been speculated that the small number of animals in these herds
317 (average 15.6 cows) contributed to the low prevalence, similar to the herd size
318 distribution of the sampled population (average nine cows).

319 Some animals in the herds may have been vaccinated, which could result in high
320 antibody titers in the milk without routinely and/or properly vaccinating for BVDV
321 (Humphry et al., 2012), which was proved to be false in the present study, since 57% of
322 case herds and 47% of the random controls were declared as being vaccinated cattle but
323 no significant association was found ($P = 0.40$), showing that there was no evidence of a
324 vaccination effect on the current BVDV serological results, as already reported (Alvarez
325 et al., 2012; Eiras et al., 2012). These findings are supported by other reports that tested
326 direct and indirect ELISA for BVDV antibodies in BTM and concluded that vaccination
327 with inactivated vaccines is not a significant limitation on using the test as a tool to
328 control BVDV in herds (Alvarez et al., 2012; Eiras et al., 2012).

329 A multivariable approach to investigate a matched case-control study and a large
330 number of putative factors were analyzed. Its important to highlight that a recent study
331 found that the majority of matched case-control studies reported in medicine use
332 improper statistical analyses and this may lead to errors in estimating the relationship
333 between a disease and exposure (Niven et al., 2012). The statistical analysis chosen in our
334 study (conditional logistic regression) carefully followed guideline recommendations
335 (Hosmer and Lemeshow, 2000; Niven et al., 2012).

336 In the present study, three models were adjusted regarding the risk of BVDV
337 infection detected by the presence of antibodies in BTM samples. The explanatory
338 variables identified in the final models as associated with BVDV were called as follows:

339 the full model - Full-1; Full-2; Full-3 and the biosecurity model - Biosecurity-1;
340 Biosecurity-2; Biosecurity-3; Biosecurity-4.

341 [Full-1]. Age as a culling criteria, was a protective factor (OR = 0.10; CI_{95%} = 0.02
342 - 0.39; $P < 0.01$). If the farmer culls animals early in life, the chance of contact (PI with a
343 susceptible animal) could be reduced and the chances of culling a PI animal may be
344 higher since BVDV affects the animal productivity when it is still at a young age and
345 makes the animal more prone to other diseases (Houe, 1999). It has also been identified
346 that older animals may have higher odds of being seropositive for BVDV. Older cows (2
347 - 5 years) had a higher risk of BVDV infection when compared with younger animals
348 (Mainar-Jaime et al., 2001). Therefore, the changes in culling management have
349 substantial importance to reduce the maintenance of PI animals within the herd, mainly if
350 they are culled before five years of age.

351 [Full-2]. Farms that provided milk to other industries previously were
352 significantly associated with BVDV seropositivity (OR = 4.13; CI_{95%} = 1.17 – 14.49; $P =$
353 0.02). It may be a proxy of some farm's characteristics or farmer behavior. In Brazil, as
354 in other countries, producers have to meet certain requirements to be eligible for selling
355 milk to the industry. Some are related to sanitary issues and other to milk quality like
356 bulk-milk somatic cell count (BMSCC). They must meet particular industry requirements
357 and conform to the national rules. In our study, it was reported by the field veterinarian
358 and from the manager of the industry that frequently the producer that had already
359 provided milk to other industries failed to meet sanitary requirements and often
360 adulterated the milk by adding banned substances to stabilize pH or even water to
361 increase the volume (F. Staggemeier, **personal communication**).

362 [Biosecurity-1]. In agreement with the above, it was found that longer period
363 providing milk to the same particular industry was negatively associated with BVDV
364 seropositivity, (OR = 0.94; CI_{95%} = 0.91 - 0.97; $P < 0.01$). The fidelity of the producer to
365 the same industry is frequent in the area of the study and it is easy to identify farms that
366 have provided milk to the same industry for over 40 years (average 24). These types of
367 producer meet the requirements from the industry and have better sanitary conditions
368 when compared to the ones that often move from one industry to another. Milk industries
369 are more likely to provide assistance and even attenuated bills to long-time producers
370 since they do not represent future risks.

371 [Full-3 & Biosecurity-2]. Isolation paddocks for ill animals were found to be
372 equally a protective factor in both models (OR = 0.14; CI_{95%} = 0.01 - 0.26; $P = 0.02$ and
373 OR = 0.06; CI_{95%} = 0.05 - 0.83; $P = 0.03$, respectively). Infected animals shed BVDV in
374 their secretions in large amounts, which increases the risk of herd mates becoming
375 infected (Lindberg and Houe, 2005). Farms that have an isolation paddock are strongly
376 preventing new animals from becoming infected, sometimes without knowing it. This
377 biosecurity measurement is especially important for young animals, which are more
378 susceptible to infections. If the intervention in a possible case of BVDV is made in the
379 early stages of disease, removing the infected animal from the herd and restricting animal
380 movement can reduce disease spread within the herd (Häsler et al., 2012); this can be
381 achieved by herds that have isolation paddocks for ill animals away from susceptible
382 animals, in places that can avoid direct and indirect contact among ill and healthy cattle.

383 [Biosecurity-3]. Natural mating was positively associated with BVDV
384 seropositivity (OR = 9.03; CI_{95%} = 2.14 - 38.03; $P < 0.01$). BVDV is transmissible by

385 natural mating and artificial insemination (AI) (Perry, 2007). Several studies have found
386 an association between BVDV and bovine reproductive management such as
387 contaminated semen and use of infected bulls (Houe, 1999; Chaves et al., 2010); since
388 acutely infected bulls shed virus in their semen for at least two weeks and PI bulls shed
389 virus constantly in their semen, this is an important information (Smith, 2007). In the
390 present study, this was the strongest risk factor found and it holds great importance for
391 BVDV transmission in the study area and so producers should be advised about this risk
392 and changes in reproduction management applied. Dairy herds are susceptible to the risk
393 of a large proportion of calves becoming PI following exposure of a naïve herd to a PI
394 bull during natural mating (Reichel et al., 2008). When the farms that used only AI for
395 reproduction were compared to the ones that used natural mating, an increased odds of
396 BVDV infections of 1.90 was found, which is clearly due to the use of infected bulls
397 (Quincozes et al., 2007). It is important to note that the consequences of natural mating
398 are dependent of virus shedding at the moment of mating and the number of cows per
399 bull (Quincozes et al., 2007). Thus, this played a critical role in the epidemiology of
400 BVDV.

401 [Biosecurity-4]. Finally, direct contact over fences among animals of neighboring
402 farms was positively associated with BVDV seropositivity (OR = 5.78; CI_{95%} = 1.41 -
403 23.67; $P = 0.04$). The most common route of BVDV transmission is direct contact
404 between animals and this risk should be closely evaluated (Barrett et al., 2002; Sandvik,
405 2004; Stahl et al., 2005; Helal and Okamatsu, 2012; Tinsley et al., 2012). Since PI
406 animals play a substantially larger role in BVDV transmission than TI cattle (Lindberg
407 and Houe, 2005) there a serious risk of giving BVDV to a BVDV-free herd by over-the-

408 fence pasture contact with an infected herd, thus BVDV will continue to circulate and the
409 costs in terms of biosecurity and breakdowns will continue to fall on those who have
410 done their best to control BVDV (Voas, 2012). Virus may also be introduced from other
411 farms at any stage, usually by contact with PI animals across a boundary fence (Stott et
412 al., 2010). In the presence of exposure from other herds sharing fencelines or communal
413 pasture, removing the source of the infection inside the herd (culling PI animals) may not
414 solve the risk of infections (Smith et al., 2010). Avoiding contact with neighboring herds
415 on fencelines decrease risk of herd infection (Smith et al., 2009). The cost to increase
416 farms' biosecurity with electrified outriggers, considering the perimeter fence of the
417 average-size farms in the study area (mean of 10 ha), is US\$2,477
418 (www.trentomateriaiseletricos.com.br; accessed 13 November). This cost is lower than
419 the cost estimated by BVDV infection (€19 to €600 per cow (Barrett et al., 2002)); in
420 areas of the USA where BVDV is endemic, economic losses for 2008 were estimated to
421 range from 361 million to 1.4 billion dollars (Rodning et al., 2012). Control of the
422 livestock trade-i.e., only allowing free herds to have pasture contacts and recommending
423 double fences towards neighboring herds-are all aimed at reducing the frequency of
424 potential contacts per time unit (k) with PI animals and acutely infected animals
425 (Lindberg and Houe, 2005). It was also identified in one case-control study that fence-to-
426 fence contact was one of the most important risk factors (OR = 2.3; CI_{95%} = 1.27 - 4.24; P
427 < 0.05), which is in accordance with our findings (Valle et al., 1999). Finally, it has also
428 been recommended that at cattle fairs and shows, a distance of at least 3 m between
429 pasture fences should be kept (Laureyns et al., 2010).

430 Variable selection or dimension reduction is fundamental to multivariable
431 statistical model building. There are two main ways of model-building selection: manual
432 selection and automatic selection of variables, and in this case we will argue about the
433 best subset selection (Zhang et al., 2004). The automated procedure uses an algorithm to
434 find a specified number of best models containing the number of variables that one may
435 wish (Furnival and Wilson, 1974). The criterion used to determine the best subset
436 selection is based on the global chi-squared statistic (model with higher global chi-
437 squared is considered the best). We found that for the full model the only independent
438 variable selected in both procedures was isolation paddocks for ill animals. This finding
439 may indicate that automated variable selection was not equal to the manual model and the
440 following should be considered. The practice of automated selection remains surprisingly
441 popular, and such models continue to appear in even the most prestigious journals, in
442 some cases using the results to draw conclusions about life-and-death and on clinical
443 issues (Babyak, 2012). Automated selection are data-driven approaches based on
444 statistical significance without reference to clinical or biological relevance, and it was
445 shown that these methods frequently produce unstable models, have biased estimates of
446 regression coefficients, and yield poor predictions (Steyerberg et al., 1999; Steyerberg et
447 al., 2000). Simulation studies have supported the earlier warnings about automated
448 selection, showing that, unless special corrections are made, the problem of overfitting
449 can be quite problematic in automated regression (Derksen and Keselman, 2011). It is
450 reasonable to consider this issue for the full model on the automated procedure, since
451 even some of the most sophisticated alternatives such as best subset regression may not

452 solve the problem of over-fitting, because more degrees of freedom are used than the
453 sample size can support (Babyak, 2012).

454 On the other hand, comparing selection approaches for the animal factor model
455 and the biosecurity model, both automatic and manual selection were able to select the
456 same independent variable combinations and either selection method could be
457 successfully applied. For the rapid generation of multiple models, we could suggest
458 applying automated modeling to reduce the time required, in particular when examining
459 large numbers of putative variables. Automated selection is convenient, easy to apply,
460 and more rapidly reduces a large complex dataset to a succinct regression model. The
461 models must be applied judiciously and the methods of data exploration should be
462 considered rather than definitive approaches to building a model (Dohoo et al., 2009). In
463 addition, it is necessary to be aware that best subsets provide more information when
464 including more variables, but it can be more complex to choose one. Because best subset
465 assesses all possible models, large models may take a long time to process. Finally, the
466 above makes it evident that variable selection improves the predictive ability of the
467 model, but it generally provides a better understanding of the underlying concept that
468 generated the data (Karagrigoriou et al., 2010).

469 There is no consensus about the best method of arriving at the final model; that is,
470 how candidate predictors are to be selected for inclusion in the multivariable analysis and
471 subsequently how predictors are selected for inclusion in the final prediction model. Two
472 broad common strategies are found in the literature, with variants within each strategy:
473 full model versus predictor selection strategy (Moons et al., 2012). It was also reported
474 that candidates to predictors could be selected and grouped based on theoretical, clinical,

475 or biological knowledge (Bouwmeester et al., 2012). Considering that, popular metrics
476 were used to compare the predictors grouped in the present study to the full model. For
477 that, AIC and BIC were used, taking into account that AIC measures predictive accuracy
478 while BIC measures goodness-of-fit (Sober, 2002). In a general sense, the model for
479 which AIC and BIC are the smallest represents the “best” approximation to the true
480 model (Sober, 2002). The biosecurity model could be considered the “best” since AIC =
481 43,880 and BIC = 48,058 (*Pseudo* $R^2 = 22.23\%$) when compared with the full model
482 where AIC = 50,445 and BIC = 53,579 (*Pseudo* $R^2 = 16.44\%$). Based on both the
483 theoretical considerations and the various simulation studies on AIC and BIC, the latter
484 seems to work better, since AIC tends to select models with too many parameters when
485 the sample size is large (Shmueli, 2010). Finally, we recommend that researchers should
486 pay close attention during model-building; in particular, grouping predictors should be
487 considered for better model achievement.

488 The important risk factors identified in the study based on biological importance
489 of BVDV and its odds were natural mating and direct contact over fences with animals of
490 neighboring farms. These main risks should be carefully considered together with the
491 other less important factors identified in a future control program and producers should
492 be advised of these risks and technical support should be provided.

493 This study may be subjected to limitations, including some types of bias. The
494 primary limitation is that the survey was restricted to a small herd population, but the
495 findings may contribute to a better understanding of the epidemiology of BVDV infection
496 in an important milk-producing region. It was beyond the scope of this study to represent
497 the whole region. The convenient extra sample of dairy herds with milk production

498 higher than 10000 L/month was necessary since BVDV-infected herds were relatively
499 rare; in this situation the case-control study design was indispensable (James J
500 Schlesselman and Paul D Stolley, 1982; Niven et al., 2012). This extra sample was used
501 only for the case-control study and did not add bias to the prevalence estimation. Efforts
502 were made to reduce confounding bias by matching case and controls by milk production;
503 using a multivariable conditional logistic regression model to better control for
504 confounding between the measured independent variables and restricting the sampling
505 period down to two months and restricting the area of study. Overmatching could be a
506 potential problem, but our cases were matched only by milk production, and so we feel
507 this could be beneficial, as this was identified early as a confounder and by matching we
508 could assess other risks factors without this bad influence (Rodrigo Saa et al., 2012).

509 This study used a blinded face-to-face interview, because the authors were aware
510 of the limitations included by other forms of accessing the information necessary, like
511 mailed surveys that may end up having a high (97%) responding rate (Valle et al., 1999),
512 but most commonly a low (40%) rate is found (Ovelhey et al., 2008) or even extremely
513 low (17%) (DeJarnette et al., 2007); this last fact may limit or exclude the possibility to
514 test for association between cause and effect. However, recall bias due to farmers' lack of
515 memory could not be ruled out.

516

517 **5. Conclusions**

518 This investigation revealed the presence of few herds with current BVDV
519 infection. The present matched case-control study aimed to identify risk factors, which
520 was achieved. It is likely that the presence of direct contact over fences with animals

521 from neighboring farms, natural mating as reproduction management, and farms that
522 provided milk to other industries previously, may increase the likelihood of BVDV
523 infection of herds. However, having isolation paddocks for ill animals, using age as
524 culling criteria, and providing milk to the same industry for decades reduced the chance
525 of BVDV infection. These findings may be useful first to the cooperative and further to
526 the implementation of a BVDV control and eradication program. This paper intends to
527 promote discussion about model-building strategy; researchers should consider grouping
528 candidate predictors based on theoretical, clinical, or biological knowledge for better
529 model achievement, especially when animal-health-modeling is on the line. We
530 recommend the application of grouping predictors as an alternative that may lead to a
531 better understanding of disease-exposure associations. Finally, the results are important
532 epidemiological contributions to historical factors believed to be associated with BVDV-
533 infected herds.

534

535 **Acknowledgements**

536 Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
537 e Tecnológico (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande
538 do Sul (FAPERGS) and Propesq/UFRGS. We thank the field team that collected the
539 blood samples and applied the questionnaire. A special thanks to Cooperativa Languiru
540 Ltda, Fernando Staggemeier and his staff that helped on logistics for the sampling and
541 questionnaire application.

542 **Reference**

- 543 Al-Afaleq, A.I., Abu-Elzein, E.M.E., Al-Khalyfah, M., 2007. Severe malformations in
544 calves associated with bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in a dairy
545 cattle herd. *Trop. Anim. Health Prod.* 39, 463-466.
- 546 Almeida, L.L., Miranda, I.C.S., Hein, H.E., Santiago Neto, W., Costa, E.F., Marks, F.S.,
547 Rodenbusch, C.R., Canal, C.W., Corbellini, L.G., 2013. Herd-level risk factors for
548 bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Res. Vet.*
549 *Sci. in press.*
- 550 Alvarez, M., Donate, J., Makoschey, B., 2012. Antibody responses against non-structural
551 protein 3 of bovine viral diarrhoea virus in milk and serum samples from animals
552 immunised with an inactivated vaccine. *Vet. J.* 191, 371-376.
- 553 Babyak, M.A., 2012. What you see may not be what you get: a brief, nontechnical
554 introduction to overfitting in regression-type models. *Psychosom. Med.* 66, 411-
555 421.
- 556 Baker, J.C., 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet.*
557 *Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 425-445.
- 558 Barrett, D.J., More, S.J., Graham, D.A., O'Flaherty, J., Doherty, M.L., Gunn, H.M., 2002.
559 Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected
560 calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. *Vet. J.* 163, 251-259.
- 561 Beaudeau, F., Belloc, C., Seegers, H., Assié, S., Sellal, E., Joly, A., 2001. Evaluation of a
562 blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV)
563 antibodies in serum and milk. *Vet. Microbiol.* 80, 329-337.
- 564 Bouwmeester, W., Zuithoff, N.P.A., Mallett, S., Geerlings, M.I., Vergouwe, Y.,
565 Steyerberg, E.W., Altman, D.G., Moons, K.G.M., 2012. Reporting and Methods
566 in Clinical Prediction Research: A Systematic Review. *PLoS Med.* 9, 100-1221.
- 567 Brownlie, J., Clarke, M.C., Howard, C.J., Pocock, D.H., 1987. Pathogenesis and
568 epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vet.*
569 18, 157-166.
- 570 Brülisauer, F., Lewis, F.I., Ganser, A.G., McKendrick, I.J., Gunn, G.J., 2010. The
571 prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in beef suckler herds in
572 Scotland. *Vet. J.* 186, 226-231.
- 573 Canal, C.W., Strasser, M., Hertig, C., Masuda, A., Peterhans, E., 1998. Detection of
574 antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of
575 genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63, 85-97.
- 576 Chaves, N.P., Bezerra, D.C., Sousa, V.E., Santos, H.P., Pereira, H.M., 2010. Frequency
577 of antibodies and risk factors of bovine viral diarrhoea virus infection in non-
578 vaccinated dairy cows in the Maranhense Amazon region, Brazil. *Ciência Rural*
579 40, 1448-1451.
- 580 DeJarnette, J.M., Sattler, C.G., Marshall, C.E., Nebel, R.L., 2007. Voluntary waiting
581 period management practices in dairy herds participating in a progeny test
582 program. *J. Dairy Sci.* 90, 1073-1079.
- 583 Derksen, S., Keselman, H.J., 2011. Backward, forward and stepwise automated subset
584 selection algorithms: Frequency of obtaining authentic and noise variables. *Br. J.*
585 *Math. Stat. Psychol.* 45, 265-282.
- 586 Dias, F.C., Samara, S.I., 2003. Detection of antibodies to the bovine viral diarrhoea virus
587 in serum, in individual milk and in bulk tank milk from unvaccinated herds. *Braz.*
588 *J. Vet. Res. Anim. Sci.* 40, 161-168.

- 589 Dohoo, I.R., Martin, S.W., Stryhn, H. (Eds.), 2009. Veterinary epidemiologic research.
590 VER Incorporated, Charlotterown, 589 p.
- 591 Eiras, C., Arnaiz, I., Sanjuán, M.L., Yus, E., Diéguez, F.J., 2012. Bovine viral diarrhoea
592 virus: Correlation between herd seroprevalence and bulk tank milk antibody
593 levels using 4 commercial immunoassays. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 549-553.
- 594 Fasina, F.O., Agbaje, M., Ajani, F.L., Talabi, O.A., Lazarus, D.D., Gallardo, C.,
595 Thompson, P.N., Bastos, A.D.S., 2012. Risk factors for farm-level African swine
596 fever infection in major pig-producing areas in Nigeria, 1997-2011. *Prev. Vet.
597 Med.* 107, 65-75.
- 598 Flores, E.F., Weiblen, R., Vogel, F.S.F., Roehe, P.M., Alfieri, A.A., Pituco, E.M., 2005.
599 A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) - histórico, situação atual
600 e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25, 125-134.
- 601 Furnival, G.M., Wilson, R.W., 1974. Regressions by Leaps and Bounds. *Technometrics*
602 16, 499-511.
- 603 Gard, J.A., Givens, M.D., Stringfellow, D.A., 2007. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV):
604 epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology* 68, 434-
605 442.
- 606 Garoussi, M.T., Haghparast, A., Estajee, H., 2008. Prevalence of bovine viral diarrhoea
607 virus antibodies in bulk tank milk of industrial dairy cattle herds in suburb of
608 Mashhad-Iran. *Prev. Vet. Med.* 84, 171-176.
- 609 Harrell, F.E., Lee, K.L., Mark, D.B., 1996. Multivariable prognostic models: issues in
610 developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and
611 reducing errors. *Stat. Med.* 15, 361-387.
- 612 Häslér, B., Howe, K.S., Presi, P., Stark, K.D.C., 2012. An economic model to evaluate
613 the mitigation programme for bovine viral diarrhoea in Switzerland. *Prev. Vet.
614 Med.* 106, 162-173.
- 615 Helal, M.A.Y., Okamoto, H., 2012. Bovine viral diarrhoea virus infection in a dairy herd
616 with high prevalence of persistently infected calves. *Jpn. J. Vet. Res.* 60, 111-117.
- 617 Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. Applied Logistic Regression. Wiley, New York,
618 392 p.
- 619 Houe, H., 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary clinics of*
620 *North America. Food Anim. Pract.* 11, 521-547.
- 621 Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus
622 diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64, 89-107.
- 623 Houe, H., 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31, 137-143.
- 624 Houe, H., Lindberg, A., Moennig, V., 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus
625 control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 427-436.
- 626 Houe, H., Meyling, A., 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish
627 dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet.
628 Med.* 11, 9-16.
- 629 Humphry, R.W., Brülisauer, F., McKendrick, I.J., Nettleton, P.F., Gunn, G.J., 2012.
630 Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and
631 associated risk factors in Scottish dairy herds. *Vet. Rec.* 171, 445.
- 632 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2010. Pesquisa pecuária municipal,
633 efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho, Brazil. Available at
634 <http://www.sidra.ibge.gov.br> (accessed January 2013)

- 635 James J Schlesselman, P.D.S., Paul D Stolley, M.D., 1982. Case Control Studies. Oxford
636 University Press, USA.
- 637 Kadohira, M., Tajima, M., 2010. A case control study of Bovine Viral Diarrhea Virus
638 (BVDV) Persistent Infection (PI) in Betsukai, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*
639 *72*, 635-638.
- 640 Kampa, J., Ståhl, K., Moreno-López, J., Chanlun, A., Aiumlamai, S., Alenius, S., 2004.
641 BVDV and BHV-1 infections in dairy herds in northern and northeastern
642 Thailand. *Acta Vet. Scand.* *45*, 181-192.
- 643 Karagrigoriou, A., Koukouvinos, C., Mylona, K., 2010. On the advantages of the non-
644 concave penalized likelihood model selection method with minimum prediction
645 errors in large-scale medical studies. *J. Appl. Statist.* *37*, 13-24.
- 646 Laureyns, J., Ribbens, S., de Kruif, A., 2010. Control of bovine virus diarrhoea at the
647 herd level: reducing the risk of false negatives in the detection of persistently
648 infected cattle. *Vet. J.* *184*, 21-26.
- 649 Lin, D.Y., Wei, L.J., 1989. The robust inference for the Cox proportional hazards model.
650 *Biometrika*, *73*, 13-22.
- 651 Lindberg, A., Houe, H., 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral
652 diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* *72*, 55-73.
- 653 Lindberg, A.L., Alenius, S., 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea
654 virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* *64*, 197-222.
- 655 Luzzago, C., Frigerio, M., Piccinini, R., Dapra, V., Zeconi, A., 2008. A scoring system
656 for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus
657 in dairy herds in Northern Italy. *Vet. J.* *177*, 236-241.
- 658 Mainar-Jaime, R.C., Berzal-Herranz, B., Arias, P., Rojo-Vazquez, F.A., 2001.
659 Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea
660 virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the
661 Asturias region of Spain. *Prev. Vet. Med.* *52*, 63-73.
- 662 Moons, K.G.M., Kengne, A.P., Woodward, M., Royston, P., Vergouwe, Y., Altman,
663 D.G., Grobbee, D.E., 2012. Risk prediction models: I. Development, internal
664 validation, and assessing the incremental value of a new (bio)marker. *Heart* *98*,
665 683-690.
- 666 Niskanen, R., 1993. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral
667 diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus.
668 *Vet. Rec.* *133*, 341-344.
- 669 Niven, D.J., Berthiaume, L.R., Fick, G.H., Laupland, K.B., 2012. Matched case-control
670 studies: a review of reported statistical methodology. *Clin. Epidemiol.* *4*, 99-110.
- 671 Niza-Ribeiro, J., Pereira, A., Souza, J., Madeira, H., Barbosa, A., Afonso, C., 2005.
672 Estimated BVDV-prevalence, -contact and -vaccine use in dairy herds in Northern
673 Portugal. *Prev. Vet. Med.* *72*, 81-85.
- 674 Ovelhey, A., Beyerbach, M., Schael, J., Selhorst, T., Kramer, M., Kreienbrock, L., 2008.
675 Risk factors for BSE-infections in Lower Saxony, Germany. *Prev. Vet. Med.* *83*,
676 196-209.
- 677 Paton, D.J., Christiansen, K.H., Alenius, S., Cranwell, M.P., Pritchard, G.C., Drew, T.W.,
678 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in
679 bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.* *142*, 385-391.

- 680 Perry, G.H., 2007. Risk assessment of transmission of bovine viral diarrhoea virus
681 (BVDV) in abattoir-derived in vitro produced embryos. *Theriogenology* 68, 38-
682 55.
- 683 Presi, P., Struchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S., Heim, D., 2011. Bovine viral diarrhoea
684 (BVD) eradication in Switzerland--experiences of the first two years. *Prev. Vet.
685 Med.* 99, 112-121.
- 686 Quincozes, C.G., Fischer, G., de Oliveira Hübner, S., 2007. Prevalence and factors
687 associated with bovine viral diarrhoea virus infection in South of Rio Grande do
688 Sul. *Semina-Ciências Agrárias* 28, 269-275.
- 689 Reichel, M.P., Hill, F.I., Voges, H., 2008. Does control of bovine viral diarrhoea
690 infection make economic sense? *N. Z. Vet. J.* 56, 60-66.
- 691 Ridpath, J.F., 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *The Veterinary clinics of
692 North America. Food Anim. Pract.* 26, 105-121.
- 693 Rodning, S.P., Givens, M.D., Marley, M.S.D., Zhang, Y., Riddell, K.P., Galik, P.K.,
694 Hathcock, T.L., Gard, J.A., Prevatt, J.W., Owsley, W.F., 2012. Reproductive and
695 economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected
696 with bovine viral diarrhoea virus into a naive group of heifers. *Theriogenology* 78,
697 1508-1516.
- 698 Rodrigo Saa, L., Perea, A., García-Bocanegra, I., Jos Arenas, A., Vinicio Jara, D.,
699 Ramos, R., Carbonero, A., 2012. Seroprevalence and risk factors associated with
700 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual
701 purpose cattle herds in Ecuador. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 645-649.
- 702 Rose, S., Laan, M.J.v.d., 2009. Why match? Investigating matched case-control study
703 designs with causal effect estimation. *Int. J. Biostat.* 5, Article 1. doi:
704 10.2202/1557-4679.1127.
- 705 Rossmann, W., Janacek, R., Wilhelm, E., 2005. Control of BVDV-infection on common
706 grassland--the key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. *Prev. Vet.
707 Med.* 72, 133-137.
- 708 Sandvik, T., 2004. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea
709 virus in Europe. *The Veterinary clinics of North America. Food Anim. Pract.* 20,
710 151-169.
- 711 Sarrazin, S., Veldhuis, A., Méroc, E., Vangeel, I., Laureyns, J., Dewulf, J., Caij, A.B.,
712 Piepers, S., Hooyberghs, J., Ribbens, S., Van Der Stede, Y., 2012. Serological and
713 virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV
714 seropositive in Belgian cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 108, 28-37.
- 715 Shmueli, G., 2010. To Explain or to Predict? *Statist. Sci.* 25, 289-310.
- 716 Smith, B.P., 2007. *Large Animal Internal Medicine*. Mosby. St. Louis. 1821 p.
- 717 Smith, R.L., Sanderson, M.W., Renter, D.G., Larson, R., White, B., 2010. A stochastic
718 risk-analysis model for the spread of bovine viral diarrhoea virus after introduction
719 to naive cow-calf herds. *Prev. Vet. Med.* 95, 86-98.
- 720 Smith, R.L., Sanderson, M.W., Renter, D.G., Larson, R.L., White, B.J., 2009. A
721 stochastic model to assess the risk of introduction of bovine viral diarrhoea virus to
722 beef cow-calf herds. *Prev. Vet. Med.* 88, 101-108.
- 723 Sober, E., 2002. Instrumentalism, Parsimony, and the Akaike Framework. *Philos. Sci.* 69,
724 S112-S123.

- 725 Solis-Calderon, J.J., Segura-Correa, V.M., Segura-Correa, J.C., 2005. Bovine viral
726 diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk
727 factors. *Prev. Vet. Med.* 72, 253-262.
- 728 Ståhl, K., Alenius, S., 2012. BVDV control and eradication in Europe—an update. *Jpn. J.*
729 *Vet. Res.*
- 730 Stahl, K., Kampa, J., Baule, C., Isaksson, M., Moreno-Lopez, J., Belák, S., Alenius, S.,
731 Lindberg, A., 2005. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the
732 final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Prev. Vet. Med.* 72, 103-
733 108.
- 734 Ståhl, K., Lindberg, A., Rivera, H., Ortiz, C., Moreno-López, J., 2008. Self-clearance
735 from BVDV infections--a frequent finding in dairy herds in an endemically
736 infected region in Peru. *Prev. Vet. Med.* 83, 285-296.
- 737 Ståhl, K., Rivera, H., Vågsholm, I., Moreno-López, J., 2002. Bulk milk testing for
738 antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev.*
739 *Vet. Med.* 56, 193-202.
- 740 Steyerberg, E.W., Eijkemans, M.J., Habbema, J.D., 1999. Stepwise selection in small
741 data sets: a simulation study of bias in logistic regression analysis. *J. Clin.*
742 *Epidemiol.* 52, 935-942.
- 743 Steyerberg, E.W., Eijkemans, M.J., Harrell, F.E., Habbema, J.D., 2000. Prognostic
744 modelling with logistic regression analysis: a comparison of selection and
745 estimation methods in small data sets. *Stat. Med.* 19, 1059-1079.
- 746 Steyerberg, E.W., Harrell, F.E., Borsboom, G.J., Eijkemans, M.J., Vergouwe, Y.,
747 Habbema, J.D., 2001. Internal validation of predictive models: efficiency of some
748 procedures for logistic regression analysis. *J. Clin. Epidemiol.* 54, 774-781.
- 749 Stott, A.W., Humphry, R.W., Gunn, G.J., 2010. Modelling the effects of previous
750 infection and re-infection on the costs of bovine viral diarrhoea outbreaks in beef
751 herds. *Vet. J.* 185, 138-143.
- 752 Sturza, D.A.F., Anziliero, D., Weiblen, R., Flores, E.F., 2011. Testes de ELISA e vírus-
753 neutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no
754 leite. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 985-990.
- 755 Sun, G.W., Shook, T.L., Kay, G.L., 1996. Inappropriate use of bivariable analysis to
756 screen risk factors for use in multivariable analysis. *J. Clin. Epidemiol.* 49, 907-
757 916.
- 758 Thobokwe, G., Heuer, C., Hayes, D.P., 2004. Validation of a bulk tank milk antibody
759 ELISA to detect dairy herds likely infected with bovine viral diarrhoea virus in
760 New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 52, 394-400.
- 761 Thrusfield, M., 2007. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science, Oxford. 610 p.
- 762 Tinsley, M., Lewis, F.I., Brülisauer, F., 2012. Network modeling of BVD transmission.
763 *Vet. Res.* 43, 11.
- 764 Valle, P.S., Martin, S.W., Tremblay, R., Bateman, K., 1999. Factors associated with
765 being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the Møre and
766 Romsdal County of Norway. *Prev. Vet. Med.* 40, 165-177.
- 767 Voas, S., 2012. Working together to eradicate BVD in Scotland. 278-279.
- 768 Zhang, H.H., Wahba, G., Lin, Y., Voelker, M., Ferris, M., Klein, R., Klein, B., 2004.
769 Variable Selection and Model Building via Likelihood Basis Pursuit. *J. Am. Stat.*
770 *Assoc.* 99, 659-672.

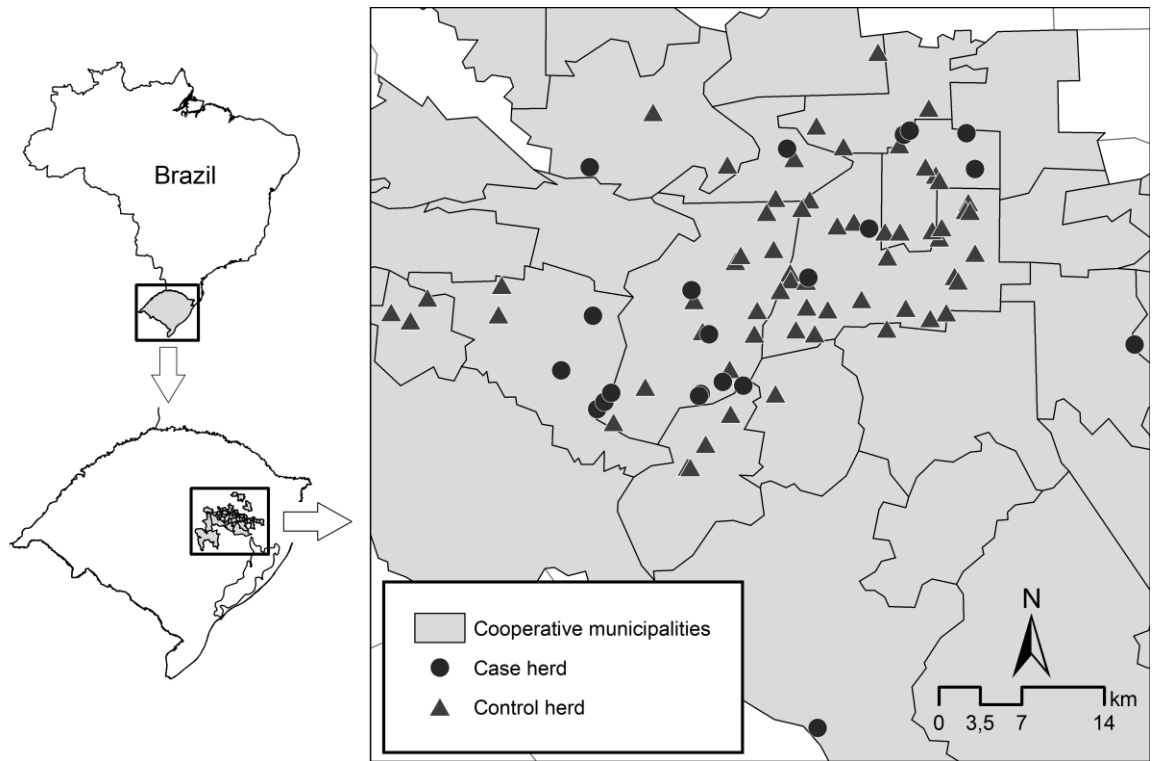
771 Zoccal, r., Assis, A.G., Evangelista, S.R.M. Distribuição geográfica da pecuária leiteira
772 no Brasil. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2006.
773 <http://cnppl.embrapa.br/nova/publicacoes/circular/CT88.pdf> (accessed January
774 2013).

775 **Table 1**
 776 Classification of 314 bulk milk samples from dairy herds from a cooperative in Rio Grande
 777 do Sul, Brazil, according to level of corrected optical density (COD), as applied in the
 778 Swedish BVDV control scheme.

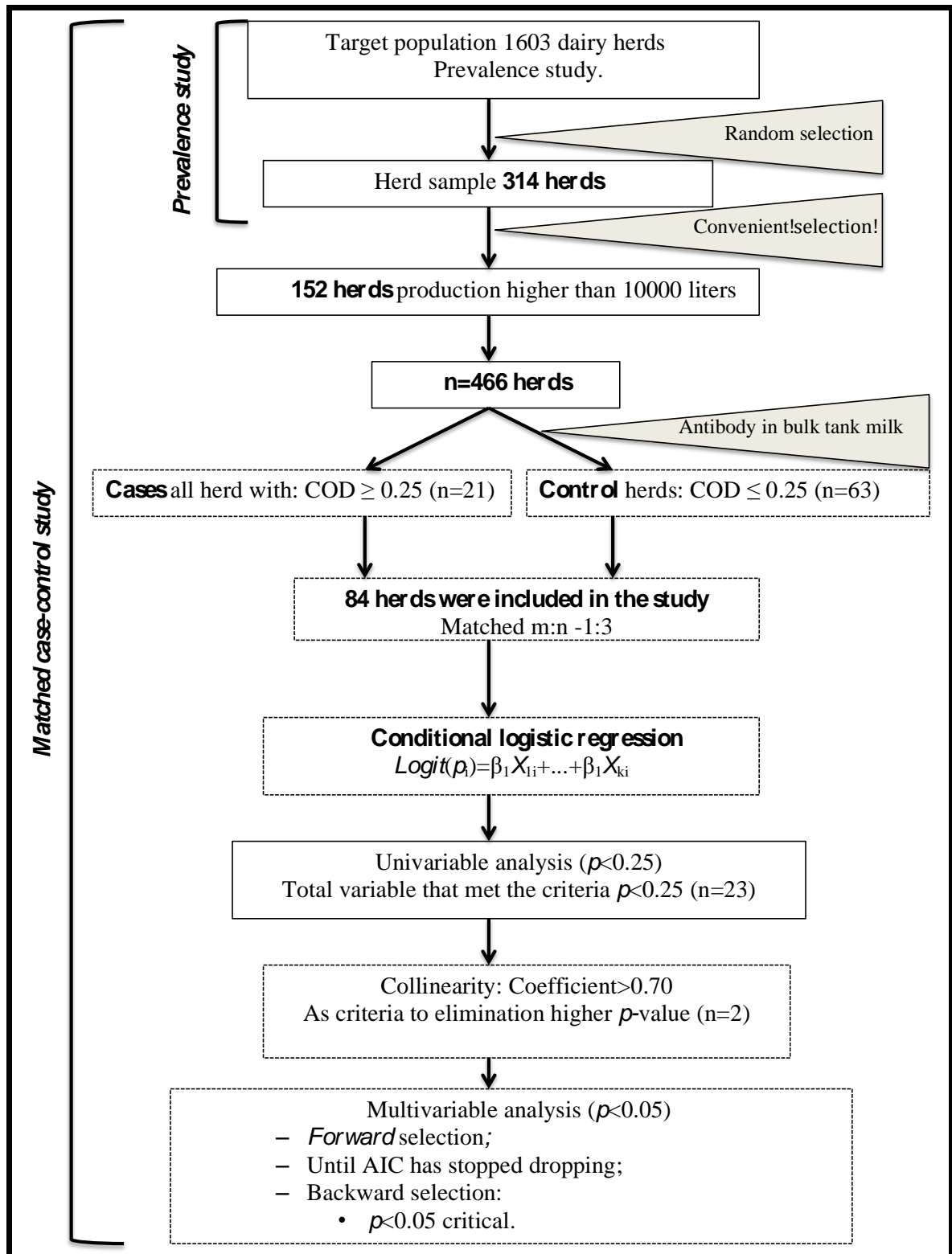
BVDV Classes (COD ^a)	Number of Herds	Apparent Prevalence (%)	95% CI ^b	
0 (< 0.05)	239	76.1	71.8	80.4
1 (0.05-0.249)	64	20.4	16.4	24.4
2 (0.25-0.549)	7	2.2	0.8	3.7
3 (\geq 0.55)	4	1.3	0.2	2.4
Overall prevalence	314	23.9	19.8	28.2

779 ^a COD = corrected optical density.

780 ^b CI = confidence interval by Normal approximation to the binomial distribution.



781 Fig. 1.



782
783
784

Fig. 2.

785

786

787

788

Table 2

Definition and distribution of explanatory variables retained at the univariable conditional logistic regression analysis*.

Variables ^a	Case n (%)	Control n (%)	P-value	OR (IC 95%)
<i>Biosecurity measure</i>				
Natural mating			0.01	
Yes	10(47.62)	13(20.63)		4.07 (1.39-11.93)
No	11(52.38)	50(79.37)		-
Isolation paddocks for ill animals			0.02	
Yes	5(23.80)	29(46.03)		0.22 (0.06-0.86)
No	16(76.20)	34(53.97)		-
Year providing milk to the same industry			0.02	
Continuous	24.22 ^b	23.74 ^b		0.96(0.94-0.99)
Farm that provided milk to other industries previously			0.04	
Yes	12(57.14)	23(36.51)		3.18(1.01-10.00)
No	9(42.86)	40(63.49)		-
Herd Size			0.07	
Continuous	21.53 ^b	21.30 ^b		0.96 (0.99-1.00)
Does have isolation paddock			0.08	
Yes	11(52.38)	51(82.26)		2.03 (0.90-4.54)
No	10(47.62)	11(17.74)		-
Different animal categories fed on same container			0.04	
Yes	5(23.80)	28(44.45)		0.39 (0.16-0.96)
No	16(76.20)	35(55.55)		-
Veterinary does have free access to all farm areas			0.11	
Yes	11(52.38)	43(68.25)		2.85(0.78-10.47)
No	10(47.62)	20(31.75)		-
Number of IA doses			0.02	
Continuous	2.03 ^b	2.03 ^b		1.71(1.06-2.76)
Grazing rotation			0.18	
Yes	15(71.43)	51(82.26)		4.07 (0.51-32.31)
No	6(28.57)	11(17.74)		-
Number of employees			0.08	
Continuous	0.35 ^b	0.16 ^b		1.18(0.97-1.44)
Number of heifers purchased			0.12	
Continuous	1.18 ^b	2.59 ^b		1.08(0.97-1.20)
Direct contact over fences among animal of neighboring farms			0.10	
Yes	16(76.20)	41(65.08)		2.23(0.83-6.00)
No	5(23.80)	22(34.92)		-
Decrease of milk production as a culling criteria			0.17	
Yes	7(33.34)	32(50.80)		0.51(0.19-1.35)
No	14(66.66)	31(49.20)		-
Divide cattle by its age on separated paddocks			0.11	
Yes	9(42.86)	37(58.74)		0.51(0.22-1.66)
No	12(57.14)	26(41.26)		-
Age as a culling criteria			0.02	
Yes	16(76.20)	45(75.00)		0.19(0.04-0.79)

No	5(23.81)	15(25.00)		-
<i>Animal risk factors measure</i>				
Number of reproductive problems on heifers				
Continuous	3.61 ^b	3.36 ^b	0.07	1.04(0.99-1.09)
Respiratory problems on calves				
Yes	5(23.80)	20(31.74)	0.09	0.37 (0.12-1.16)
No	16(76.20)	43(68.26)		-
Reproductive problems as culling criteria				
Yes	16(76.20)	44(69.85)	0.11	2.85(0.78-10.34)
No	5(23.80)	19(30.15)		-
Calves with limited development				
Yes	10(47.62)	20(31.75)	0.14	1.87(0.81-4.93)
No	11(52.38)	43(68.25)		-
In the last year abortion occurred				
Yes	16(76.20)	43(68.26)	0.17	2.21 (0.69-6.99)
No	5(23.80)	20(31.74)		-
Presence of ticks on purchased animals				
Yes	9(42.86)	18(28.58)	0.14	1.84 (0.81 -4.15)
No	12(57.14)	45(71.42)		-

789
790

^a Variables with $P < 0.25$, ^b Mean of the continuous variables, * Univariable conditional logistic regression .

791

792 **Table 3**793 Multivariable conditional logistic regression analysis of variables from the full model
794 associated with BVDV on BTM in a matched case-control study^c.

Variables	Estimate (β) ^a	S.E. ^b	<i>P</i> -value	Matched odds (CI: 95%)
Isolation paddocks for ill animals				
Yes	-1.93	0.93	0.02	0.14(0.01-0.26)
No	-	-	-	-
Age as a culling criteria				
Yes	-2.24	1.03	< 0.01	0.10(0.02-0.39)
No	-	-	-	-
Farm that provided milk to other industries previously				
Yes	1.41	0.67	0.02	4.13 (1.17-14.49)
No	-	-	-	-

795

^{a,b} Results given with Estimate (β), standard errors (S.E.), *P*-values and Odds with 95% CI.

796

^c Overall data of the model: AIC = 50.445, BIC = 53,579, Pseudo R^2 = 16.44%

797 **Table 4**
 798 Multivariable conditional logistic regression analysis of variables from subsets of variables
 799 according to empirical knowledge: 3) the biosecurity model associated with BVDV on
 800 BTM in a matched case-control study^c.

Variables	Estimate (β) ^a	S.E. ^b	P-value	Odds (CI: 95%)
Natural mating				
Yes	2.20	0.85	< 0.01	9.03(2.14-38.03)
No	-	-	-	-
Isolation paddocks for ill animals				
Yes	-2.75	1.10	0.03	0.06(0.05-0.83)
No	-	-	-	-
Year providing milk to the same industry				
Continuous	-0.06	0.02	< 0.01	0.94(0.91-0.97)
Direct contact over fences among animal of neighboring farms				
Yes	1.75	0.87	0.04	5.78(1.41-23.67)
No	-	-	-	-

801 ^{a,b} Results given with Estimate (β), standard errors (S.E.), P-values and Odds with 95% CI.

802 ^c Overall data of the model: AIC = 43.880, BIC = 48,058 , Pseudo R² = 22.23%

803

804 **Table 5**
 805 Best subset regression procedure conditional logistic regression model produced for both:
 806 1) the full model and 3) the biosecurity model.

Number of variables	Chi-square		Component variables (see below)	
	<u>Full model</u>	<u>Biosecurity model</u>	<u>Full model</u>	<u>Biosecurity model</u>
7	27.27	26.93	d,e,f,n,m,h,g	A,B,C,D,E,H,I
6	25.03	24.91	f,c,h,i,l,m	A,B,C,E,H,I
5	22.62	21.54	d,e,f,g,h	C,D,E,H,I
4	18.86	17.77	d,e,f,g	A,B,C,H
3	14.53	14.33	a,b,c	A,B,C

807 A,a: Natural mating; B,b: Isolation paddocks for ill animals; C,c: Year providing milk to the same industry;
 808 D,h: Days of isolation; E,i: Different animal categories fed on same container; F,j: Number of IA doses; G,g:
 809 Use of computer to keep herd information; H,l: Direct contact over fences among animal of neighboring
 810 farms; I,m: Divide cattle by its age on separated paddocks; d: Number of reproductive problems on heifers; e:
 811 Respiratory problems on calves; f: reproductive problems on cows; g: farm that provided milk to other
 812 industries previously; n: Calves with limited development.
 813

814 **Figures legends**

815 **Fig. 1.** Geographic location of the municipalities on the eastern-central region (gray area).

816 Geolocation of the herds and BVDV serological status according to classes based on
817 corrected optical density (COD). Case herds-BTM as class 2 - herds (COD 0.25 -
818 0.549) or class 3 - herds (COD \geq 0.55) and Controls were selected at random bases
819 from the reminiscent negative herds (n = 437), that tested as class 0 or 1 - both classes
820 suggest a low or very low antibody titers in the BTM (COD 0.05 - 0.249), according to
821 the COD cut-offs used in the Swedish BVDV control scheme. Insert: location of the
822 studied region (dark area) within the State of Rio Grande do Sul (gray area), Brazil.

823 **Fig. 2.** Diagram of design and data collection of a cross sectional study with statistical
824 model summarized, with follow-up of associations between BVDV anybody titers
825 conducted from August 2011 to September 2011 on Brazilian dairy herds.

826

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos achados do estudo apresentado pode-se considerar que a prevalência real estimada através das amostras de leite de tanque, as quais representam a população em produção ativa de leite foi de 24,3% ($CI_{95\%} = 20,1 - 28,6\%$) foi baixa quando comparada com estudos realizados em outros países. Entretanto, o mais importante é ressaltar que comparativamente com os estudos realizados no Brasil, a grande maioria com problemas sérios em seu poder de estimação pelo fato de utilizarem amostras de conveniência para “estimar a prevalência” (amostras recebidas em laboratórios de diagnóstico), a prevalência encontrada no presente estudo é baixa. Talvez as prevalências de BVDV em nível de rebanho e em nível animal estejam sendo superestimadas pelos estudos já publicados, e este fato tem se perpetuado ao longo dos anos pela replicação em livros, periódicos nacionais e notas técnicas. Com isso vale ressaltar a necessidade de mais estudos a respeito da infecção por BVDV, porém baseados em amostras probabilísticas.

A estratégia mais comum para a construção de modelos multivariáveis preditivos em medicina humana e veterinária é o método de seleção automático (seleção *forward*, eliminação *backward* ou *stepwise*). O método automático é orientado pelos dados baseados em significância estatística, sem referência a importância biológica das variáveis, além disso, tem sido demonstrado que este método frequentemente produz modelos instáveis, podendo resultar em coeficientes de regressão instáveis e modelos com previsões pobres. Porém, se pode modelar quantas simulações foram desejadas através de algoritmos, mas ainda não há uma alternativa adequada para substituição de um pesquisador, o qual é de fundamental importância na tomada de decisões em cada etapa do processo de modelagem. No presente estudo foi testado um método automático com o objetivo de selecionar possíveis variáveis preditoras e comparar com os resultados do método de seleção manual que permite a decisão do pesquisador a cada etapa do processo de modelagem, permitindo que se leve em conta a plausibilidade biológica do modelo, possibilitando a redução de variáveis preditoras até que o modelo com melhor parcimônia seja encontrado. Fica evidente a importância da aplicação do método manual, pois apenas no modelo de biossegurança as mesmas variáveis foram selecionadas pelos dois métodos, se apenas o

método de seleção automática fosse empregado o presente estudo falharia em identificar o modelo que melhor explica a variação das variáveis preditoras.

A aplicação do pareamento em estudos de caso-controle é rotineiramente utilizada com o objetivo de eliminar os efeitos dos confundidores. Um confundidor é uma variável responsável por distorcer a associação entre a exposição de interesse, variável independente (exemplo: contato direto entre animais) e o resultado, variável dependente (exemplo: resultado de um ELISA para BVDV). O controle de um confundidor (viés) deve ser realizado no planejamento do estudo ou após o mesmo. Por exemplo, se a presença de médico veterinário é considerado/identificado como sendo um confundidor para a presença de BVDV no rebanho, durante o estudo pode-se excluir propriedades onde há assistência veterinária ou como alternativa, após o estudo realizar o pareamento, nesse caso as propriedades casos (resultado positivo para BVDV) com a presença de médicos veterinários devem ser pareados por propriedades controles (resultado negativo para BVDV) com a presença de médicos veterinários. Com o pareamento por produção de leite no presente estudo pode-se controlar este viés de forma efetiva, isso pode ser notado pelos intervalos de confiança nos modelos finais e por baixos valores de erro padrão.

REFERÊNCIAS

- ARENHART, S., BAUERMANN, F. V., OLIVEIRA, S. A. M., WEIBLEN, R., FLORES, E. F. Shedding and transmission of bovine viral diarrhoea virus by persistently infected calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 736–742, 2009.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 425–445, 1995.
- BARTLETT, P. C., VAN BUREN, J. W., BARTLETT, A. D., ZHOU, C. Case-control study of risk factors associated with feline and canine chronic kidney disease. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p. 1–10, 2010.
- BEAUDEAU, F., BELLOC, C., SEEGER, H., ASSIÉ, S., SELLAL, E., JOLY, A. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. **Veterinary Microbiology**, v. 80, p. 329–337, 2001a.
- BEAUDEAU, F., ASSIÉ, S., SEEGER, H., BELLOC, C., SELLAL, E., JOLY, A. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. **Veterinary Record**, v. 149, p. 236–240, 2001b.
- BOLIN, S. R., GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, p. 51–68, 2004.
- BOLIN, S. R., MCCLURKIN, A. W., CUTLIP, R. C., CORIA, M. F. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 573–576, 1985.
- BOTTON, S. A., DA-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. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 31, p. 1429–1438, 1998.
- BRESLOW, N. E., DAY, N. E., HALVORSEN, K. T., PRENTICE, R. L., SABAI, C. Estimation of multiple relative risk functions in matched case-control studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 108, p. 299–307, 1978.
- BROCK, K. V., GROOMS, D. L., RIDPATH, J., BOLIN, S. R. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 22–26, 1998.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et Technique**, v. 9, p. 43–59, 1990.

BROWNLIE, J., CLARKE, M. C. Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis. **Intervirology**, v. 35, p. 51–59, 1993.

CASARO, A. P., KENDRICK, J. W., KENNEDY, P. C. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, p. 1543–1562, 1971.

CASAUBON, J., VOGT, H. R., STALDER, H., HUG, C., RYSER-DEGIORGIS, M. P. Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 1–14, 2012.

CHASE, C. C. L. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. **Biologicals**, v. 41, p. 52–60, 2012.

CHAVES, N. P., BEZERRA, D. C., SOUSA, V. E., SANTOS, H. P., PEREIRA, H. M. Frequency of antibodies and risk factors of bovine viral diarrhoea virus infection in non-vaccinated dairy cows in the Maranhense Amazon region, Brazil. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1448–1451, 2010.

DIAS, F. C., SAMARA, S. I. Detection of antibodies to the bovine viral diarrhoea virus in serum, in individual milk and in bulk tank milk from unvaccinated herds. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 161–168, 2003.

DOHOO, I. R., MARTIN, S. W., STRYHN, H. **Veterinary epidemiologic research**. 2. ed. Charlottetown, PEI, Canada: VER Inc., 2009. 589 p.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 41, p. 8–13, 2012.

EIRAS, C., ARNAIZ, I., SANJUÁN, M. L., YUS, E., DIÉGUEZ, F. J. Bovine viral diarrhoea virus: Correlation between herd seroprevalence and bulk tank milk antibody levels using 4 commercial immunoassays. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 549–553, 2012.

EPP, T., WALDNER, C., ARGUE, C. K. Case-control study investigating an anthrax outbreak in Saskatchewan, Canada--Summer 2006. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, p. 973–978, 2010.

FIRESTONE, S. M., SCHEMANN, K. A., TORIBIO, J. A., WARD, M. P., DHAND, N. K. A case-control study of risk factors for equine influenza spread onto horse premises during the 2007 epidemic in Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, p. 53–63, 2011.

- FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1. ed. Santa Maria: Editoraufsm, 2007. 888 p.
- FLORES, E. F. Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). **Biológico**, v. 65, p. 3–9, 2003.
- FLORES, E. F., WEIBLEN, R., VOGEL, F. S. F., ROEHE, P. M., ALFIERI, A. A., PITUCO, E. M., A. infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 125–134, 2005.
- FREY, H. R., FLEBBE, U., LIESS, B. Prevalence and clinical symptoms of persistent BVD-virus infection in cattle herds of Lower Saxony. **Praktische Tierarzt**, v. 77, p. 49–52, 1996.
- GAROOUSSI, M. T., HAGHPARAST, A., ESTAJEE, H. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bulk tank milk of industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 84, p. 171–176, 2008.
- GONDA, M. G., FANG, X., PERRY, G. A., MALTECCA, C. Measuring bovine viral diarrhoea virus vaccine response: Using a commercially available ELISA as a surrogate for serum neutralization assays. **Vaccine**, v. 30, p. 6559–6553, 2012.
- GOTTER, V., BLAHA, T., KLEIN, G. A case-control study on the occurrence of Salmonella spp. in the environment of pigs. **Epidemiology and Infection**, v. 140, p. 150–156, 2012.
- GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus**. 1. ed. Victoria: Wiley-Blackwell. 2008. 272 p.
- GRIMES, D. A., SCHULZ, K. F. Bias and causal associations in observational research. **Lancet**, v. 359, p. 248–252, 2002.
- GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, p. 20, v. 5–19, 2004.
- GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, p. 624–628, 2006.
- GOODMAN, M. S., LI, Y. Nonparametric Diagnostic Test for Conditional Logistic Regression. **Journal of Biometrics & Biostatistics**, v. 03, p. 1–6, 2012.
- GUARINO, H., NÚÑEZ, A., REPISO, M. V., GIL, A., DARGATZ, D. A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, p. 34–40, 2008.
- HANON, J. B., VAN DER STEDE, Y., ANTONISSEN, A., MULLENDER, C., TIGNON, M., VAN DEN BERG, T., CAIJ, B. Distinction Between Persistent and Transient Infection in a Bovine Viral Diarrhoea (BVD) Control Programme: Appropriate Interpretation of

Real-Time RT-PCR and Antigen-ELISA Test Results. **Transboundary and Emerging Diseases**, In press, 2012

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

HOUE, H. Bovine virus diarrhoea virus: detection of Danish dairy herds with persistently infected animals by means of a screening test of ten young stock. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 19, p. 241–248, 1994.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 521–547, 1995.

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

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

HUMPHRY, R. W., BRÜLISAUER, F., MCKENDRICK, I. J., NETTLETON, P. F., GUNN, G.J. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and associated risk factors in Scottish dairy herds. **Veterinary Record**, v. 171(18), p. 445, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006 Resultados Preliminares**. Rio de Janeiro: IBGE, [146p.], 2006. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>>. Acesso em 20 Nov. 2012.

JUNTTI, N., LARSSON, B., FOSSUM, C. The Use of Monoclonal Antibodies in Enzyme Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 34, p. 356–363, 1987.

KAMPA, J., STAHL, K., RENSTRÖM, L. H. M., ALENIUS, S. Evaluation of a commercial Enns-capture ELISA for detection of BVDV in routine diagnostic cattle serum samples. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, p. 1–7, 2007.

KAMPA, J., STÅHL, K., MORENO-LÓPEZ, J., CHANLUN, A., AIUMLAMAI, S., ALENIUS, S. BVDV and BHV-1 infections in dairy herds in northern and northeastern Thailand. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 45, p. 181–192. 2004.

KATZ, J. B., HANSON, S. K. Competitive and blocking enzyme-linked immunoassay for detection of fetal bovine serum antibodies to bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**, v. 15, p. 167–175, 1987.

KUHNE, S., SCHROEDER, C., HOLMQUIST, G. Detection of Bovine Viral Diarrhoea

Virus Infected Cattle – Testing Tissue Samples Derived from Ear Tagging Using an Erns Capture ELISA. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 52, p. 272–277, 2005.

LAUREYNS, J., PIEPERS, S., RIBBENS, S., SARRAZIN, S., DE VliegHER, S., VAN CROMBRUGGE, J. M., DEWULF, J. Association between herd exposure to BVDV-infection and bulk milk somatic cell count of Flemish dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, In press, 2012.

LINDBERG, A., HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 55–73, 2005.

LIU, L., XIA, H., WAHLBERG, N., BELÁK, S., BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, p. 351–357, 2009.

LUZZAGO, C., FRIGERIO, M., PICCININI, R., DAPRA, V., ZECCONI, A. A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy. **Veterinary Journal**, v. 177, p. 236–241, 2008.

MCCLURKIN, A. W., CORIA, M. F., CUTLIP, R. C. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 174, p. 1116–1119, 1979.

MCCLURKIN, A. W., LITLEDIKE, E. T., CUTLIP, R. C., FRANK, G. H., CORIA, M. F., BOLIN, S. R. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 156–161, 1984.

MELLOR, D. J., LOVE, S. Cases, controls and confounders. **Veterinary Journal**, v. 156, p. 1–2, 1998.

MEYLING, A., HOUE, H., JENSEN, A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 9, p. 75–93, 1990.

MOERMAN, A. A., STRAVER, P. J. P., DE JONG, M. C. M., QUAK, J. J., BAANVINGER, T. T., VAN OIRSCHOT, J. T. J. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 132, p. 622–626, 1993.

NETTLETON, P. F., ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses. **British Veterinary Journal**, v. 151, p. 615–642, 1995.

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

NISKANEN, R., ALENIUS, S., LARSSON, B. Evaluation of an Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Bovine Virus Diarrhoea Virus in Milk. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 36, p. 1–10, 2010

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, Supplement**, v. 3, p. 245–251, 1991.

NISKANEN, R., EMANUELSON, U., SUNDBERG, J., LARSSON, B., ALENIOUS, S. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 23, p. 229–237, 1995.

NISKANEN, R., LINDBERG, A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. **Veterinary Journal**, v. 165, p. 125–130, 2003.

NIZA-RIBEIRO, J., PEREIRA, A., SOUZA, J., MADEIRA, H., BARBOSA, A., AFONSO, C. Estimated BVDV-prevalence, -contact and -vaccine use in dairy herds in Northern Portugal. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 81–85, 2005.

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, p. 385–391, 1998.

PATON, D. J., IBATA, G., EDWARDS, S., WENSVOORT, G. An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes. **Journal of Virological Methods**, v. 31, p. 315–324, 1991.

PETERHANS, E., BACHOFEN, C., STALDER, H., SCHWEIZER, M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v. 41, p. 41–44, 2010.

PETERHANS, E., JUNGI, T. W., SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. **Biologicals**, v. 31, p. 107–112, 2003.

PETERHANS, E., SCHWEIZER, M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 18–25, 2010.

POLETTI, R., KREUTZ, L. C., GONZALES, J. C., BARCELLOS, L. J. G. Prevalence of tuberculosis, brucellosis and viral infections in dairy cattle from the county of Passo Fundo, RS, Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 595–598, 2004.

QUINCOZES, C. G., FISCHER, G., DE OLIVEIRA HÜBNER, S. Prevalence and factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in South of Rio Grande do Sul. **Semina-Ciências Agrárias**, v. 28, p. 269–276, 2007.

RAUE, R., HARMEYER, S. S., NANJIANI, I. A. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. **Veterinary Journal**, v. 187, p. 330–334, 2011.

REINHARDT, G., RIEDEMANN, S., ERNST, S., AGUILAR, M., ENRIQUEZ, R., GALLARDO, J. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea/mucosal disease in southern Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, p. 73–78, 1990.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 105–121, 2010a.

RIDPATH, J. F. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 335–348, 2010b.

RIDPATH, J. F., BOLIN, S. R., DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66–74, 1994.

RIKULA, U., NUOTIO, L., AALTONEN, T., RUOHO, O. Bovine viral diarrhoea virus control in Finland 1998-2004. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 139–142, 2005.

ROSE, S., LAAN, M. J. V. D. Why match? Investigating matched case-control study designs with causal effect estimation. **International Journal of Biostatistics**, v. 5(1), p. 1–24, 2009.

ROTHMAN, K. J., GREENLAND, S., LASH, T. L. **Modern Epidemiology**. 3. ed. Lippincott Williams & Wilkams. 2008. 720 p.

SAINANI, K. L., POPAT, R. A. Understanding Study Design. **PM & R**, v. 3, p. 573–577, 2011.

SARRAZIN, S., VELDHUIS, A., MÉROC, E., VANGEEL, I., LAUREYNS, J., DEWULF, J., CAIJ, A. B., PIEPERS, S., HOOYBERGHS, J., RIBBENS, S., VAN DER STEDE, Y. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 108, p. 28–37, 2012.

SCHLESSELMAN, J. J., STOLLEY, M. D. **Case Control Studies: Design, Conduct, Analysis**. Oxford University Press, USA. 1982. 368 p.

SCHULZ, K. F., GRIMES, D. A. Case-control studies: research in reverse. **Lancet**, v. 359, p. 431–434. 2002.

SMITH, R. L., SANDERSON, M. W., RENTER, D. G., LARSON, R. L., WHITE, B. J. A stochastic model to assess the risk of introduction of bovine viral diarrhoea virus to beef

cow-calf herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, p. 101–108, 2009.

SONNENSCHNEIN, E. G., GLICKMAN, L. T., GOLDSCHMIDT, M. H., MCKEE, L. J. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **American Journal Epidemiology**, v. 133, p. 694–703, 1991.

STÅHL, K., ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe—an update. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. S21–S39, 2012.

STÅHL, K., LINDBERG, A., RIVERA, H., ORTIZ, C., MORENO-LÓPEZ, J. Self-clearance from BVDV infections—a frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 83, p. 285–296, 2008.

STOTT, A. W., HUMPHRY, R. W., GUNN, G. J. Modelling the effects of previous infection and re-infection on the costs of bovine viral diarrhoea outbreaks in beef herds. **Veterinary Journal**, v. 185, p. 138–143, 2010.

STURZA, D. A. F., ANZILIERO, D., WEIBLEN, R., FLORES, E. F. Testes de ELISA e vírus-neutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 985–990, 2011.

SYNGE, B. A., CLARK, A. M., MOAR, J. A., NICOLSON, J. T., NETTLETON, P. F., HERRING, J. A. The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 223–229, 1999.

TALAFHA, A. Q., HIRCHE, S. M., ABABNEH, M. M., AL-MAJALI, A. M., ABABNEH, M. M. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 499–506, 2009.

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

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. 3. ed. Oxford: Wiley-Blackwell. 2007. 624 p.

TRÅVÉN, M. M., ALENIUS, S. S., FOSSUM, C. C., LARSSON, B. B. Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 38, p. 453–462, 1991.

VALLE, P., MARTIN, S., TREMBLAY, R., BATEMAN, K. Factors associated with being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the Møre and Romsdal County of Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, p. 165–177, 1999.

VALLE, P. S., SKJERVE, E., MARTIN, S. W., LARSEN, R. B., OSTERAS, O., NYBERG, O. Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 189–207, 2005.

VOAS, S. Working together to eradicate BVD in Scotland. **Veterinary Record**, v. 170, p. 278–279, 2012.

WENG, H. Y., MESSAM, L. L. M. Making inferences from a case-control study: Implications of sampling. **Veterinary Journal**, v. 194, p. 282–287, 2012.

APÊNDICE A – Questionário epidemiológico aplicado em 84 propriedades visitadas

Texto padrão para introdução aos proprietários (respondentes)

*Bom dia senhor(a), somos alunos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) estamos aqui por causa de um trabalho da Universidade onde o objetivo é verificar a **saúde** de seus animais. Para isso pedimos permissão ao senhor(a) para coletar 5 mL de sangue de 5 animais jovens de 6 a 18 meses de idade além de fazer algumas perguntas breves a respeito do manejo de sua propriedade, o senhor(a) pode nos ajudar?*

Data da aplicação: ____ / ____ / ____.		Entrevistador: _____.	
Pontos de GPS: <u>LAT</u> : _____		<u>LONG</u> : _____.	
Nº Matrícula.: _____.		Idade do proprietário: _____.	
O respondente é o proprietário? ()sim ()não			
Escolaridade do proprietário()		1. Não estudou 2. 1º Grau incompleto 3. 1º Grau completo 4. 2º Grau incompleto 5. 2º Grau completo 6. 3º Grau incompleto	
Características gerais da propriedade			
1	Área aproximada (hectares) utilizada na criação de bovinos? () 1.1 Número total de bovinos? ()		
2	Propriedade possui funcionário(s)? ()sim ()não ()quantos (Caso não pule a Q.2.1) 2.1 Trabalham em outras propriedades também? ()sim ()não		
3	Quantas pessoas trabalham com as vacas leiteiras? () 3.1 Quantos(a)? Mulheres () Homens ()		
4	Em porcentagem, o quanto a produção de leite representa para a renda da família? ()0-10% ()51-60% ()11-20% ()61-70% ()21-30% ()71-80% ()31-40% ()81-90% ()41-50% ()91-100%		
5	A quanto tempo está na atividade (Produção de leite)? _____ meses/anos		
6	A quanto tempo você fornece leite para a Languiru? _____ meses/anos		

7	Já forneceu leite para outras cooperativas? ()sim ()não
8	Qual das seguintes alternativas que eu te disser melhor se enquadra com o tipo de criação da propriedade? ()Animais ficam somente a campo e não recebem ração (Extensiva) ()Animais ficam a campo e recebem ração (Semi-intensivo) ()Animais confinamento recebem concentrado e não vão para campo (Intensiva)
9	Raça predominante em seu rebanho? Holandesa () Jersey ()
Biosseguridade	
10	Levou animais a feiras e/ou exposições de JANEIRO DE 2010 ATÉ A DATA DE HOJE? ()sim ()não
11	Realizou a troca de animais JANEIRO DE 2010 ATÉ A DATA DE HOJE? ()sim ()não ()quantos
12	Comprou animais de JANEIRO DE 2010 ATÉ A DATA DE HOJE? ()sim ()não Estes animais eram: <i>Em caso de compra marque os campos <u>sim</u> ou <u>não</u> para as categorias aplicáveis e o <u>número</u> de animais</i> Vacas vazias ()sim ()não ()quantos Vacas prenhas ()sim ()não ()quantos Novilhas ()sim ()não ()quantos Bezerros ()sim ()não ()quantos Touros ()sim ()não ()quantos
13	Em relação aos animais que entram na propriedade (seja compra e/ou troca), são isolados do rebanho antes de serem introduzidos no rebanho? ()sim ()não Quanto tempo de isolamento? () ≤ de 30 dias () 31 – 60 dias () ≥ de 61 dias
14	Em relação aos animais introduzidos no rebanho quais dos itens abaixo o Sr.(a) exige do fornecedor (vendedor do animal e/ou o responsável pela troca) Animal em boas condições corporais ()sim ()não

	<p>Certificado de livre de TB e Brucelose ()sim ()não</p> <p>Certificado de livre de BVDV ()sim ()não</p> <p>Animal livre de parasitas ()sim ()não</p> <p>Raça ()sim ()não</p> <p>Estilo(aptidão) para leite ()sim ()não</p>
15	<p>Existe algum piquete/baia para isolamento de animais doentes que previna o contato focinho-focinho do resto do rebanho?</p> <p>()sim ()não</p>
16	<p>O que o Sr.(a) faz quando um animal fica doente?</p> <p>Trata por conta própria (aplica medicamento injetável) ()sim ()não</p> <p>Usa agulhas descartáveis e novas para cada animal (<i>não aplicável para vacinas somente para medicamentos</i>) ()sim ()não</p> <p>Chama o Médico Veterinário ()sim ()não</p>
17	<p>Quem aplica injeções nos animais?</p> <p>Dono da propriedade ()sim ()não</p> <p>Funcionários ()sim ()não</p> <p>Médico Veterinário ()sim ()não</p>
18	<p>O técnico ou Médico Veterinário tem livre acesso aos animais? ()sim ()não</p> <p>18.1 O técnico/Veterinário chega de carro até dentro do campo/galpão dos mais?</p> <p>()sim ()não</p>
19	<p>O Sr.(a) observou a presença de animais selvagens na região? ()sim ()não</p> <p>() Macacos</p> <p>() Cachorro do mato</p> <p>() Veados</p> <p>() Ouriço</p> <p>() Gambá</p> <p>Outros? _____</p>
20	<p>Faz restrição à entrada de pessoas estranhas? ()sim ()não</p>
21	<p>Faz restrição à entrada de vizinhos? ()sim ()não</p>
Manejo reprodutivo	
22	<p>Fez inseminação ()sim ()não</p>

	() quantas doses/por animal (utilizar somente um valor, porém pode ser quebrado exemplo: 1.3 doses)
23	Qual é a idade média da primeira parição? (Em meses)? ()
24	Fez repasse com monta natural de JANEIRO DE 2010 ATÉ A DATA DE HOJE? (Caso não pule a Q.24.1) () sim () não
	24.1 Caso sim utilizou touro? () Criado na propriedade () Comprado () Emprestado
25	Os partos acontecem onde? No campo/pastagem () sim () não No galpão/baia () sim () não
26	Após o parto, quando os bezerros são separados da mãe? () Imediatamente (sem mamar) () Após a primeira mamada mas não mais que 24 horas após o parto () Mais que 24 horas
27	Possui piquete de parição/pós parto? () sim () não
Condições sanitárias	
28	Animais de mais de uma categoria animal se alimentam no mesmo cocho? () sim () não
29	Animais de mais de uma categoria animal bebem água no mesmo bebedouro? () sim () não
30	Você registrou no período de JANEIRO DE 2010 ATÉ A DATA DE HOJE:
	30.1 Nascimento de bezerros fracos? () sim () não () quantos
	30.2 Aborto(s)? () sim () não () quantos () Primeiro trimestre () Segundo trimestre () Terceiro trimestre
Agora a respeito de novilhas (12-24 meses)	
	30.3 Realizou tratamento para problemas respiratórios (pneumonias)? () sim () não () quantos
	30.4 Realizou tratamento para diarreias? () sim () não () quantos
	30.5 Realizou tratamento para problemas reprodutivos (inclui sincronização)? () sim () não () quantos

Agora a respeito dos bezerros (0-12 meses)

- 31** De JANEIRO DE 2010 ATÉ A DATA DE HOJE
Quais dos seguintes tipos de problemas que o Sr. (a) notou na propriedade
- Perda de peso --- ()sim ()não
- Crescimento retardado --- ()sim ()não
- Mortes --- ()sim ()não
- Diarreias --- ()sim ()não
- Problemas respiratórios --- ()sim ()não
- 32** Quais dos seguintes tipos de parasitas são observados nos animais?
- Moscas domésticas --- ()sim ()não
- Moscas do chifre --- ()sim ()não
- Mutucas --- ()sim ()não
- Carrapatos --- ()sim ()não
- 33** Quais das seguintes alternativas são motivos de descarte **das vacas** do rebanho?
- Queda na produção de leite ---()sim ()não
- Idade --- ()sim ()não
- Mastite --- ()sim ()não
- Diarreias --- ()sim ()não
- Problemas respiratórios --- ()sim ()não
- Problemas reprodutivos --- ()sim ()não
- Laminites ou machucados/acidentes ---()sim ()não

Manejo/instalações

- 34** Como o Sr.(a) mantém os dados da produção de leite?
- Mantêm algum tipo de dado ()sim ()não
- Escritos a mão (caderno) ()sim ()não
- No computador ()sim ()não
- 35** Seus animais têm contato físico* com os animais dos vizinhos?
- *Contato físico quer dizer: contato focinho-focinho ou espiro/contato/lambidas um com o outro, incluindo através da cerca.*
- ()sim ()não com quantos vizinhos()

	35.1 Dividem os animais por idade em piquetes diferentes? ()sim ()não
	35.2 Bezerros ficam em piquetes com presença de árvores? ()sim ()não
	35.3 Ocorre queda de cercas entre os campos? () não ()raramente ()frequentemente
	35.4 Qual o destino dos animais mortos? ()Enterra Outro qual? _____
36	Utiliza pastagem em comum com animais de outras propriedades? ()sim ()não () quantas
	36.1 Faz rotação de pastagem? ()sim ()não
37	Qual dos seguintes animais você possui: Obs: (marcar quais tem contato físico* ou com o alimento, sal mineral, bebedouro água comum com o rebanho ou com os campos e instalações onde os bovinos transitam) [] <i>*Contato físico quer dizer: contato focinho-focinho ou espirro/contato/lambidas um com o outro, incluindo através da cerca</i>
	37.1 Suínos? ()sim ()não ()quantos []
	37.2 Aves? ()sim ()não ()quantos []
	37.3 Ovinos? ()sim ()não ()quantos [] <i>Ovinos dividem pasto com bovinos? ()sim ()não</i>
	37.4 Cão? ()sim ()não ()quantos []
	37.5 Caprinos? ()sim ()não ()quantos []
	37.6 Gatos? ()sim ()não ()quantos []
38	Qual é a origem da água fornecida aos animais?
	38.1 Água encanada ()sim ()não
	38.2 Poço artesiano ()sim ()não
	38.3 Cursos naturais (rio,lagoa,açude, sanga)()sim ()não
39	A alimentação dos animais é feita a base de:
	39.1 Ingredientes produzidos na propriedade? ()sim ()não
	39.2 Compra da LANGUIRU? ()sim ()não
	39.3 Comprada alguma outra marca? ()sim ()não

40 Quanto a organização e limpeza da sala de ordenha?

Bom

Médio

Ruim

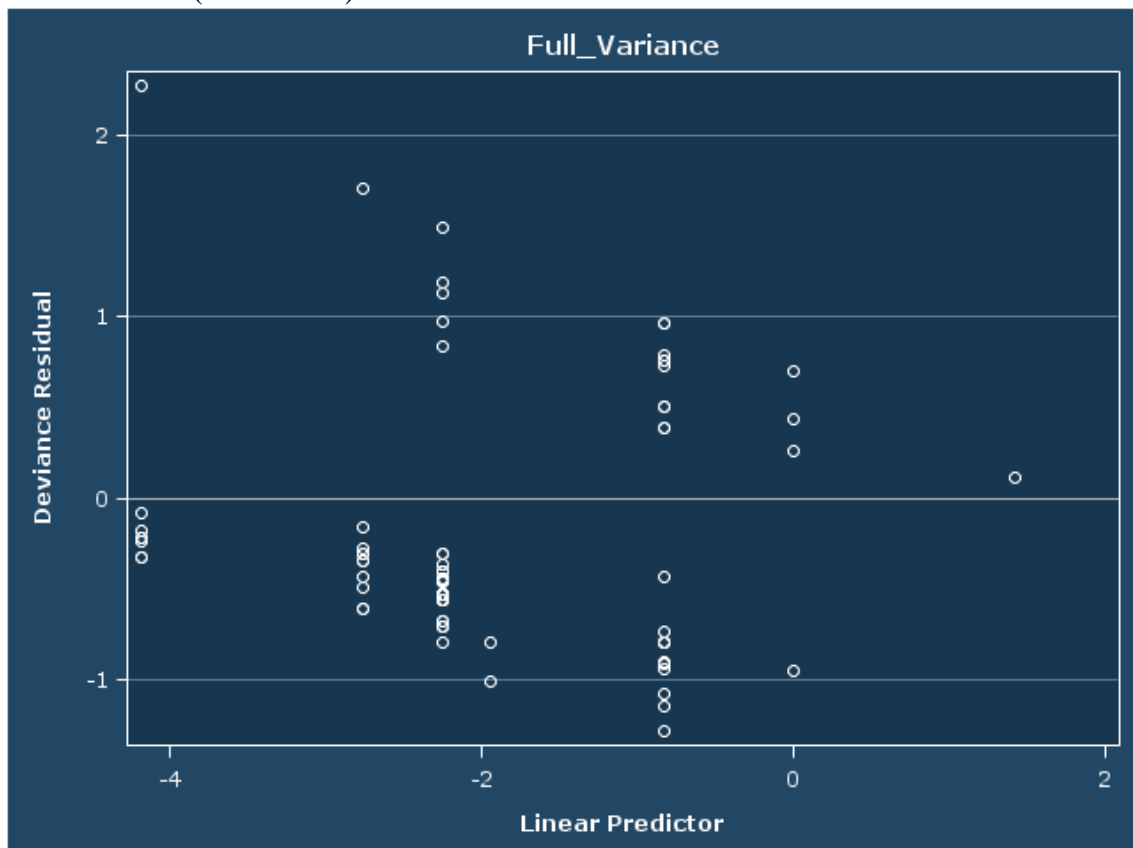
APÊNDICE B – Análise de resíduos (marginais) do modelo completo [Full model]

SAS code:

```
proc phreg data=leite noprint;
model status*censor(0)= piqisoldoent1 idade2 leiteoutrascoop3;
output out=leite xbeta=xb resmart=Mart resdev=Dev;
strata ProdPares;
run;
```

```
title "Full_Variance" ;
proc sgplot data=leite;
yaxis grid;
refline 0 /axis=y;
scatter y=Dev x=Xb;
run;
```

¹ Possuir piquete de isolamento de animal doente (dicotômica); ² Idade como critério de eliminação do animal do rebanho (dicotômica); ³ Já forneceu leite a outra cooperativa anteriormente (dicotômica).



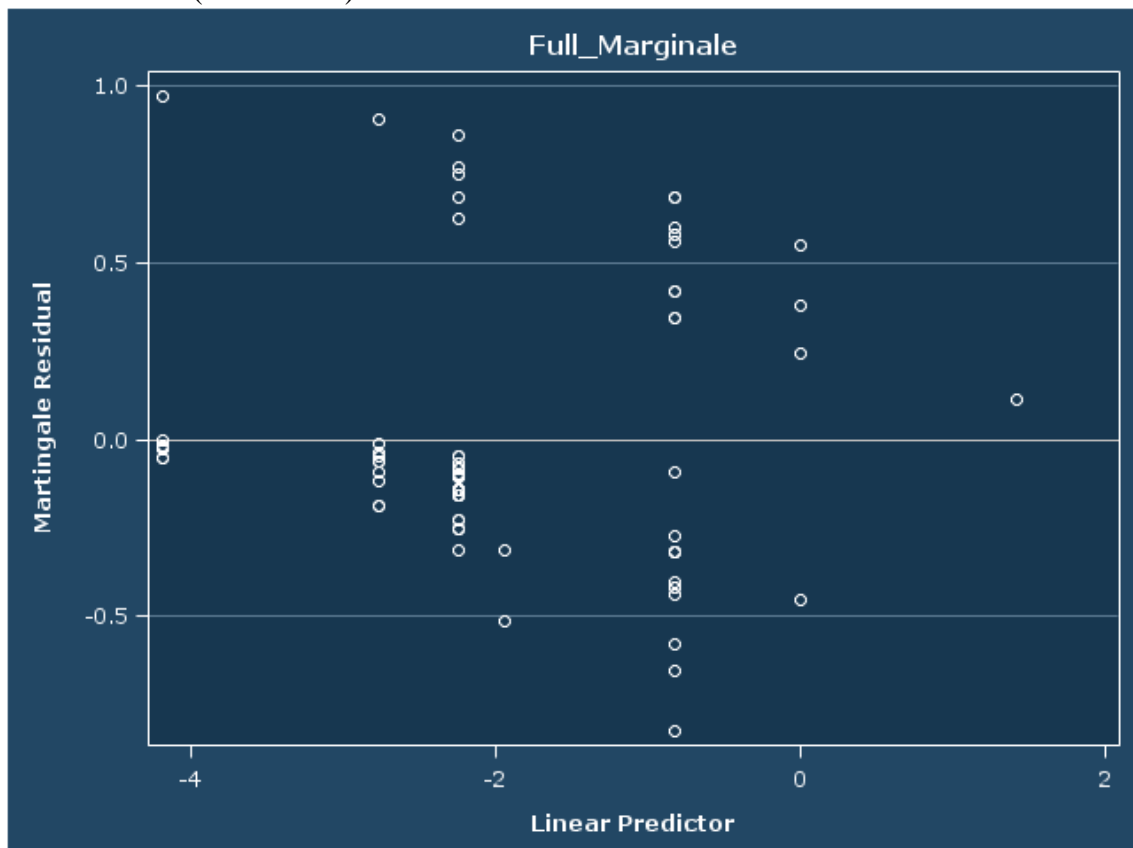
APÊNDICE C – Análise de resíduos (desvio) do modelo completo [Full model]

SAS code:

```
proc phreg data=leite noprint;
model status*censor(0)= piqisoldoent1 idade2 leiteoutrascoop3;
output out=leite xbeta=xb resmart=Mart resdev=Dev;
strata ProdPares;
run;
```

```
title "Full_Marginale";
proc sgplot data=leite;
yaxis grid;
refline 0 /axis=y;
scatter y=Mart x=Xb;
run;
```

¹ Possuir piquete de isolamento de animal doente (dicotômica); ² Idade como critério de eliminação do animal do rebanho (dicotômica); ³ Já forneceu leite a outra cooperativa anteriormente (dicotômica).



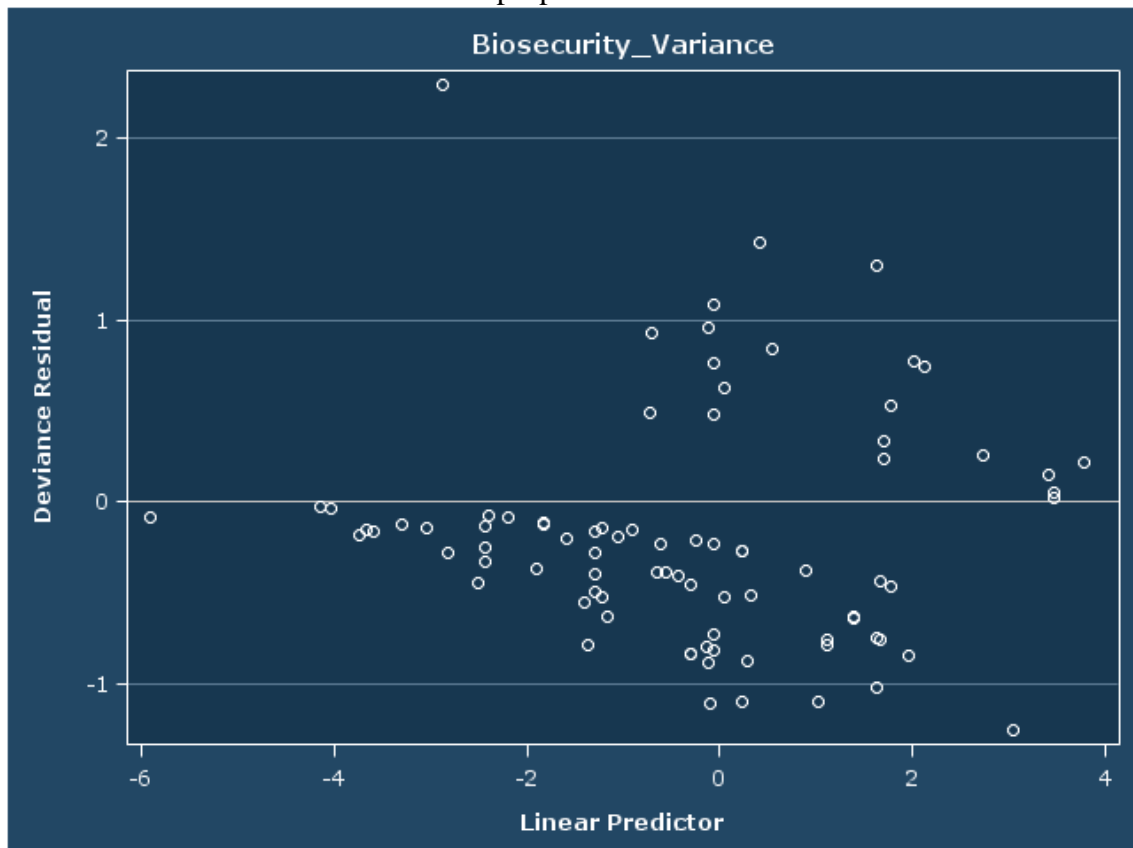
APÊNDICE D – Análise de resíduos (marginais) do modelo de biossegurança
[Biosecurity model]

SAS code:

```
proc phreg data=leite noprint;
model status*censor(0)= repassenatural1 piqisoldoent2 tempocoop3 contatofisicovizinhos4;
output out=leite xbeta=xb resmart=Mart resdev=Dev;
strata ProdPares;
run;
```

```
title "Biosecurity_Variance" ;
proc sgplot data=leite;
yaxis grid;
refline 0 /axis=y;
scatter y=Dev x=Xb;
run;
```

¹ Faz repasse natural (dicotômica); ² Possuir piquete de isolamento de animal doente (dicotômica); ³ Tempo em anos de fornecimento de leite a mesa cooperativa (contínua); ⁴ Contato físico direto entre bovinos de propriedades vizinhas.



APÊNDICE E – Análise de resíduos (desvio) do modelo de biossegurança [Biosecurity model]

SAS code:

```
proc phreg data=leite noprint;
model status*censor(0)= repassenatural1 piqisoldoent2 tempocoop3 contatofisicovizinhos4;
output out=leite xbeta=xb resmart=Mart resdev=Dev;
strata ProdPares;
run;
```

```
title "Biosecurity_Marginale";
proc sgplot data=leite;
yaxis grid;
refline 0 /axis=y;
scatter y=Mart x=Xb;
run;
```

¹ Faz repasse natural (dicotômica); ² Possuir piquete de isolamento de animal doente (dicotômica); ³ Tempo em anos de fornecimento de leite a mesa cooperativa (contínua); ⁴ Contato físico direto entre bovinos de propriedades vizinhas.

