

# Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras de tanques de leite de rebanhos do Rio Grande do Sul\*

## Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in bulk milk samples of dairy herds in the Rio Grande do Sul state, Brazil

Larissa Picada Brum,\*\* Eduardo Furtado Flores,\*\*\* Rudi Weiblen,\*\*\*\* Charles Fernando Capinos Scherer,\*\*\*\*\* Luiz Carlos Kreutz,\*\*\*\*\* João Walter Dürr,\*\*\*\*\* Valter Leonardo de Quadros,\*\* Marcelo de Lima,\*\* Ketty Cristina Mazzutti,\*\*\*\*\* Kleiton Adolfo Pan\*\*\*\*\*

### Resumo

Uma técnica de soro-neutralização rápida (SNR), anteriormente adaptada para a detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no leite foi utilizada para a pesquisa de anticorpos anti-BVDV em amostras de recipientes coletivos de leite de propriedades leiteiras no Rio Grande do Sul. Inicialmente, a SNR foi comparada com um teste comercial do tipo ELISA, na pesquisa de anticorpos em amostras de leite de 430 vacas de *status* sorológico conhecido. Das 430 amostras testadas, as duas técnicas concordaram em 368 (85,6%), sendo 266 positivas (61,9%) e 102 negativas (23,8%). Comparando-se com os resultados do ELISA, a SNR apresentou uma sensibilidade de 90,8%, especificidade de 74,4% e precisão de 85,5%. O grau de concordância (k) foi de 0,65, que significa uma boa associação entre as técnicas. A técnica de SNR foi então utilizada para testar amostras de recipientes coletivos de leite de 11.711 rebanhos do estado do Rio Grande do Sul. Anticorpos contra o BVDV foram detectados no leite de 1.028 rebanhos (8,8%), sendo que 180 propriedades (1,5% do total) apresentaram títulos altos ( $\geq 80$ ) de anticorpos no leite, sugerindo possuírem infecção ativa. Esses resultados demonstraram que a técnica de SNR é adequada para a detecção de anticorpos anti-BVDV no leite e pode ser utilizada em triagens para a identificação de rebanhos positivos para o BVDV.

*Palavras-chave:* vírus da diarreia viral bovina, BVDV, diagnóstico, leite, anticorpos, ELISA.

### Abstract

The rapid virus neutralization test (RVN), previously adapted for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in milk was employed to search for BVDV antibodies in bulk milk samples from dairy herds in the Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil. Initially, the RVN was compared to a commercial ELISA test, in the detection of BVDV antibodies in milk samples of 430 cows of known serological status. Among the 430 milk samples tested, the two techniques agreed in 368 results (85.6%), being 266 positive (61.9%) and 102 negative (23.8%). Comparing with the ELISA results, the RVN presented a 90.8% sensitivity, 74.4% specificity and 85.5% accuracy. The concordance level (k) reached 0.65, which means a good association between the two tests. Then, the RVN test was used to test bulk milk samples collected from 11.711 dairy herds of the state. Antibodies to BVDV were detected in the milk samples of 1.028 herds (8.8%); and 180 herds (1.5%) had high antibody titers ( $\geq 80$ ) in milk, suggesting they harbor active infection. These results demonstrate that the RVN is suitable for detecting BVDV antibodies in bulk milk and may be used for herd screening to identify BVDV positive herds.

*Keywords:* bovine viral diarrhoea virus, BVDV, diagnostic, milk, antibodies, ELISA.

---

\*Trabalho realizado com suporte financeiro do MCT, CNPq, Capes e FINEP (Pronex em Virologia Veterinária, 215/96).

\*\* Aluno de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria (PPGMV/UFSM).

\*\*\* Professor Adjunto. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) e Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM. Bolsista do CNPq (520758/96-0). DMVP/CCR/UFSM, CEP 97105-900. Santa Maria, RS. Fone/fax: 55-220-8034. E mail: flores@ccr.ufsm.br . Autor para correspondência.

\*\*\*\* Professor Titular. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP/UFSM). Bolsista do CNPq (520161/97-1).

\*\*\*\*\* Médico Veterinário, MSc. Atual endereço: Plum Island Animal Disease Center/PIADC/USDA. Greenport, NY, USA.

\*\*\*\*\* Professor Adjunto da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, UPF. Passo Fundo, RS.

\*\*\*\*\*Estudante do Curso de Medicina Veterinária, UFSM. Bolsista de Iniciação Científica, PIBIC. CNPq .

## Introdução

O vírus da Diarréia Viral Bovina (*bovine viral diarrhoea virus*, BVDV) é um dos patógenos mais importantes de bovinos. A repercussão econômica e sanitária da infecção é significativa pela sua ampla distribuição geográfica e pela sua alta prevalência, principalmente em rebanhos leiteiros (Baker, 1995). O BVDV é um vírus pequeno (40-60nm de diâmetro), envelopado, possui como genoma uma molécula de RNA de polaridade positiva, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (Francki et al., 1991). O gênero *pestivirus* inclui ainda outros dois importantes patógenos de animais domésticos, o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) de ovinos (Horzinek, 1991).

A infecção de bovinos imunocompetentes pelo BVDV pode resultar em infecção inaparente, doença respiratória ou digestiva (diarréia viral bovina, BVD), doença das mucosas (MD) e BVD aguda/hemorrágica (Corapi et al., 1989; Baker, 1995). A infecção de fêmeas soronegativas prenhes freqüentemente resulta em transmissão do vírus ao feto, podendo ocasionar perdas embrionárias ou fetais, malformações, mortalidade perinatal e o nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (Baker, 1995). Os animais PI são geralmente soronegativos e excretam o vírus continuamente, constituindo-se na principal fonte de infecção e perpetuação do vírus nos rebanhos (Brownlie, 1990; Baker, 1995). O controle da infecção pelo BVDV passa necessariamente na detecção e eliminação dos animais PI, associado ou não a programas de vacinação sistemática de fêmeas soronegativas, para prevenir a infecção fetal (Dubovi, 1992).

Em rebanhos que possuem animais PI, grande parte dos animais entra em contato com o vírus e desenvolve anticorpos específicos em um curto espaço de tempo (Houe, 1995). Nesses rebanhos, além da possível ocorrência de casos clínicos e perdas reprodutivas, a maioria dos animais apresenta títulos altos de anticorpos neutralizantes contra o BVDV (Niskanen, 1993). Títulos moderados ou altos de anticorpos no soro de vacas em lactação geralmente são associados com anticorpos em níveis detectáveis no leite (Niskanen, 1993). Por isso, a presença de anticorpos anti-BVDV em amostras de leite coletadas de recipientes coletivos tem sido utilizada como indicativo da presença de animais PI em programas de controle e erradicação da infecção na Europa (Niskanen et al., 1991; Niskanen, 1993; Paton et al., 1998). Nesses programas, a utilização de um teste imunoenzimático do tipo ELISA para a pesquisa de anticorpos em amostras coletivas de leite tem viabilizado a realização de triagens de rebanhos em grande escala (Niskanen et al., 1991; Paton et al., 1998).

Embora a infecção pelo BVDV esteja amplamente difundida no rebanho bovino do Brasil (Botton et al., 1998; Pituco e Del Fava, 1998; Roehe et al., 1998), não existem programas oficiais de combate à infecção. Programas voluntários ou oficiais de controle em grande escala poderiam ser viabilizados pela disponibilidade de testes para triagem e identificação de rebanhos infectados à distância. Nesse sentido, foi recentemente relatada a adaptação e padronização de um teste de soro-neutralização (SN) para a pesquisa de anticorpos anti-BVDV no leite (Scherer et al., 2002). No presente estudo, a técnica adaptada (soro-neutralização rápida [SNR]) foi comparada a um teste comercial do tipo ELISA na detecção de

anticorpos anti-BVDV em amostras de leite. Posteriormente, a técnica de SNR foi utilizada para a pesquisa de anticorpos contra o BVDV em amostras coletadas de recipientes coletivos de leite de 11.711 rebanhos leiteiros do RS, com o objetivo de se identificar rebanhos com títulos altos de anticorpos no leite, prováveis portadores de animais PI.

## Material e métodos

### *Amostras de soro e leite*

Para a comparação dos testes de SNR e ELISA, foram testadas 430 amostras de leite de vacas previamente examinadas para anticorpos séricos contra o BVDV. Essas amostras eram provenientes de 12 rebanhos leiteiros localizados na região central do Rio Grande do Sul e foram enviadas resfriadas ao laboratório. Para a realização dos testes, as amostras de leite foram previamente centrifugadas a 3.000 x g por 15min a 4°C. A fase aquosa situada abaixo da camada de gordura foi coletada e inativada a 56°C por 30 min. As amostras de soro também foram submetidas ao tratamento de inativação. A pesquisa de anticorpos em amostras coletivas de leite foi realizada em alíquotas (5ml) de leite coletadas de recipientes (tarros, tanques de resfriamento) de 11.711 rebanhos leiteiros do RS. As amostras foram coletadas no CEPA (Centro de Estudos para a Alimentação, Universidade de Passo Fundo, UPF), a partir de amostras enviadas pelos produtores para a pesquisa de células somáticas e enviadas sem resfriamento, com adição do conservante Bronopol (2-bromo-2nitropropane-1, 3-diol).

### *Pesquisa de anticorpos no soro e no leite*

As amostras de soro foram testadas para a presença de anticorpos neutralizantes contra o BVDV através da técnica de soro-neutralização (SN) e as amostras de leite foram testadas pelas técnicas de soro-neutralização rápida (SNR) e ELISA. As técnicas de SN e SNR foram realizadas de acordo com protocolos descritos por Scherer et al. (2002).

### *Ensaio imunoenzimático (ELISA)*

As amostras de leite de 430 vacas testadas para anticorpos pela técnica de SNR foram também testadas pela técnica de ELISA. Para isso, utilizou-se um *kit* ELISA comercial (Bovine Viral Diarrhoea [BVDV] Antibody Test kit, IDEXX). Todos os procedimentos para a realização da técnica foram realizados de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, utilizando-se os controles positivos e negativos que acompanham o *kit*. No teste, utilizaram-se amostras de leite não diluídas (100ml por cavidade), com incubação de 90 min a temperatura ambiente em câmara úmida. A leitura do teste foi realizada em um espectrofotômetro de leitura automática (Anthos htIII), utilizando-se comprimento de onda de 450nm. Para interpretação dos resultados, utilizaram-se os cálculos para validação do teste e classificação de amostras em positivas e negativas de acordo com o manual do fabricante.

Os parâmetros sensibilidade, especificidade, precisão da SNR em relação ao ELISA foram calculados de acordo com Coggon et al. (1993) e o índice de concordância (k) foi calculado e interpretado de acordo com Riegelman e Hirsch (1991).

## Resultados e discussão

Os resultados da comparação entre os testes de SNR e ELISA para a detecção de anticorpos contra o BVDV no leite de 430 vacas estão apresentados na Tabela 1. As duas técnicas apresentaram resultados concordantes em 368 amostras (85,6%), sendo 266 amostras positivas (61,9%) e 102 negativas (23,8%). Trinta e cinco amostras (8,1%) foram positivas na SNR e negativas no ELISA. Destas, 26 amostras (74,3%) eram oriundas de animais soropositivos e nove eram provenientes de vacas soronegativas. Por outro lado, das 27 amostras (6,2%) que foram negativas na SNR e positivas no ELISA, 17 (63%) foram coletadas de vacas soronegativas e dez amostras eram provenientes de vacas soropositivas. Considerando-se o teste ELISA como padrão, a SNR apresentou sensibilidade de 90,8%, especificidade de 74,4% e precisão de 85,5%. O grau de concordância (k) foi de 0,65, o que significa uma boa associação entre as técnicas (Riegelman e Hirsch, 1991).

**Tabela 1:** Comparação entre as técnicas de soroneutralização rápida (SNR) e ELISA na detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em amostras de leite de 430 vacas.

| Técnica                        | ELISA     |             |             |     |
|--------------------------------|-----------|-------------|-------------|-----|
|                                | Positivas | Negativas   | Total       |     |
| Soroneutralização rápida (SNR) | Positivas | 266 (61,9%) | 35 (8,1%)   | 301 |
|                                | Negativas | 27 (6,2%)   | 102 (23,8%) | 129 |
|                                | Total     | 293         | 137         | 430 |

A seguir, estudou-se a associação entre a detecção de anticorpos detectáveis no leite pela SNR e ELISA e o *status* sorológico das vacas (soropositivas/soronegativas para o BVDV pela SN). Os resultados desses testes estão apresentados na Tabela 2. A técnica de SNR apresentou sensibilidade e especificidade superiores ao ELISA, detectando 12 amostras positivas a mais entre as amostras de vacas soropositivas e oito amostras negativas a mais entre as amostras de vacas soronegativas. Esses resultados demonstram que a técnica de SNR apresentou sensibilidade e especificidade maiores que o ELISA, considerando-se o *status* sorológico das vacas determinado anteriormente pela técnica tradicional de SN. Ainda assim, um número significativo de amostras de leite de animais soropositivos não foi detectado por nenhuma das técnicas.

**Tabela 2:** Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em amostras de leite de 430 vacas de *status* sorológico conhecido, pelas técnicas de soroneutralização rápida (SNR) e ELISA.

|                             |           | Anticorpos no leite |            |             |            | Total |
|-----------------------------|-----------|---------------------|------------|-------------|------------|-------|
|                             |           | SNR                 |            | ELISA       |            |       |
|                             |           | Positivas           | Negativas  | Positivas   | Negativas  |       |
| Status sorológico das vacas | Positivas | 284 (66%)           | 86 (20%)   | 272 (63,3%) | 98 (22,8%) | 370   |
|                             | Negativas | 9 (2,1%)            | 51 (11,9%) | 17 (3,9%)   | 43 (10%)   | 60    |
| Total                       |           | 293                 | 137        | 289         | 141        | 430   |

Estudos anteriores demonstraram que a SNR é capaz de detectar anticorpos no leite de vacas com títulos séricos a partir de 10. A correlação entre anticorpos no leite e títulos séricos, no entanto, é baixa quando se examinam vacas com títulos séricos de 10 e 20. O percentual de amostras de leite que é detectada como positiva varia entre 33,3% (em vacas com títulos séricos de 10) e 97,4%, em animais com títulos de >320 no soro (Scherer et al., 2002). É provável, portanto, que grande parte das amostras de leite de vacas soropositivas que foram negativas em ambos os testes sejam de animais com títulos séricos baixos. Como os títulos no leite são sempre inferiores aos títulos séricos, é esperado que amostras de leite de animais com títulos séricos baixos não contenham níveis detectáveis de anticorpos. Portanto, a técnica de SNR pode ser recomendada para utilização para detectar-se anticorpos em vacas com títulos séricos a partir de 20 ou 40.

Por outro lado, a falha da SNR em detectar amostras com títulos baixos de anticorpos não compromete a sua utilização, pois a técnica foi adaptada justamente para detectar amostras de leite que contenham níveis moderados a altos de anticorpos (Scherer et al., 2002). Rebanhos com títulos baixos de anticorpos no tanque coletivo (e que possivelmente não sejam detectados pela SNR) provavelmente não possuem infecção ativa e animais PI, portanto, não devem constituir-se em alvos de programas de controle/erradicação (Niskanen, 1993; Paton et al., 1998).

Um teste ELISA para detecção de anticorpos anti-BVDV em amostras de tarros de leite tem sido utilizado em programas de controle e erradicação da infecção pelo BVDV na Europa (Paton et al., 1998; Lindberg e Alenius, 1999). Rebanhos positivos no teste são posteriormente investigados para a identificação da origem da infecção (Niskanen et al., 1991; Niskanen, 1993; Lindberg e Alenius, 1999). O objetivo principal da adaptação do teste de SN para a pesquisa de anticorpos anti-BVDV no leite foi viabilizar a sua utilização para triagem de rebanhos leiteiros (Scherer et al., 2002). Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados pela técnica são compatíveis com a sua utilização em triagens de rebanhos para identificar aqueles com atividade viral recente ou atual.

Após a padronização e validação do teste, passou-se a utilizar a técnica de SNR para pesquisar anticorpos anti-BVDV em amostras de leite coletadas de recipientes coletivos de 11.711 rebanhos, que correspondem a aproximadamente 20% dos rebanhos comerciais de leite do Rio Grande do Sul.

O teste dessas amostras foi realizado em duas etapas. Na primeira, quando se realizou uma triagem, testando-se as amostras de leite na diluição de 1:20, identificaram-se 1.028 rebanhos positivos (8,8%) (Tabela 3).

Em uma segunda etapa, os anticorpos nas amostras positivas foram quantificados. Os resultados desses testes, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos e por região geográfica, estão apresentados na Tabela 3. Considerando-se títulos  $\geq 80$ , foram identificadas

180 propriedades (1,5% do total). Em programas de controle visando a detecção de rebanhos positivos, propriedades com títulos a partir dessa magnitude deveriam ser alvo de procedimentos para a identificação e remoção de animais PI (Niskanen, 1993; Paton et al., 1998; Lindberg e Alenius, 1999).

Os países europeus que utilizam a detecção de anticorpos no leite para triagem de rebanhos não utilizam vacinação contra o BVDV. Então, resultados positivos no teste indicam necessariamente resposta à infecção natural (Niskanen, 1993; Lindberg e Alenius, 1999). Em regiões onde se utiliza a vacinação, a identificação de rebanhos positivos pelo teste do leite deve ser seguida de investigação do *status* vacinal de cada rebanho para determinar-se a origem da sorologia positiva.

Em resumo, a técnica de SNR apresentou sensibilidade e especificidade adequadas para a detecção de anticorpos no

**Tabela 3:** Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em amostras de tarros ou tanques de resfriamento de rebanhos leiteiros no estado do Rio Grande do Sul<sup>a</sup>.

| Região                            | Título <sup>b</sup> |     |     |     |     | Positivas/total | %      |
|-----------------------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----------------|--------|
|                                   | 20                  | 40  | 80  | 160 | 320 |                 |        |
| 1 - Noroeste Riograndense         | 367                 | 181 | 88  | 21  | 1   | 658/9510        | 6,9    |
| 2 - Nordeste Riograndense         | 6                   | 12  | 4   | 0   | 0   | 24/28           | 85,7   |
| 3 - Centro Ocidental Riograndense | 81                  | 65  | 38  | 7   | 0   | 191/748         | 25,5   |
| 4 - Centro Oriental Riograndense  | 38                  | 24  | 2   | 0   | 0   | 64/431          | 14,8   |
| 5 - Sudoeste Riograndense         | 3                   | 2   | 6   | 0   | 0   | 11/57           | 19,2   |
| 6 - Sudeste Riograndense          | 45                  | 24  | 12  | 01  | 0   | 82/937          | 8,7    |
| Positivas                         | 540                 | 308 | 150 | 29  | 1   | 1.028           | 8,8    |
| Total                             |                     |     |     |     |     | 100             | 11.711 |

<sup>a</sup> Detectados pela técnica de soroneutralização rápida (SNR).

<sup>b</sup> Foram quantificados os anticorpos das amostras que apresentaram título <sup>3</sup> 20 na triagem inicial.

leite. O teste do leite de 11.711 rebanhos leiteiros do RS revelou um número significativo de rebanhos com títulos altos de anticorpos. Após investigação do *status* vacinal, esses rebanhos deveriam ser alvo de procedimentos subseqüentes para a identificação da origem dessa sorologia.

## Referências

- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. North Amer.*, v. 11, p. 425-446, 1995.
- BOTTON, S.A.; SILVA, A.M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. & FLORES, E.F. Antigenic characterization of brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 31, p. 1429-1438, 1998.
- COGGON, T.; ROSE, G.; BARKER D. J. Measurement error and bias. In: *Epidemiology for the uninitiated*. 3. ed. *British Medical Journal*, p. 20-25, 1993.
- CORAPI W.V.; MOENNIG V.; HORZINEK, M. 1989. Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.*, v. 70, p.253-266, 1989.
- DUBOVI E. J. Genetic diversity and BVD virus. *Comp. Immun. Microbiol. Dis.*, v. 15, p.155-162, 1992.
- FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, (Suppl. 2), p. 223-233, 1991.
- HORZINEK, M. Pestiviruses: taxonomic perspectives. *Arch. Virol.*, {Suppl. 3}, p.1-5, 1991.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am.*, v. 11, p. 521-548, 1995.
- LINDBERG, A.; ALENIOUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.*, v. 64, p. 197-222, 1999.
- 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. *Arch. Virol.*, (Suppl. 3), p. 245-251, 1991.
- 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. *Vet. Rec.*, v. 133, p. 341-344, 1993.
- 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. *Vet. Rec.*, v. 4, p. 385-391, 1998.
- PITUCO, E.M.; DEL FAVA C. Situação do BVDV na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 e 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV). 1998, Santa Maria, RS. *Anais... Laboratório de Virologia – UFSM*, 175 p., p. 49-57, 1998.
- RIEGELMAN, A. K.; HIRSCH A. P. Como estudiar un estudio y probar una proba: lectura crítica de la literatura médica. *Bol. Of. San. Pan.*, v. 11, p. 534-555, 1991.
- ROEHE P.M.; OLIVEIRA, E.A.S.; OLIVEIRA, L.G.; MUNOZ, J.C.P. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no país. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 e 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV). 1998, Santa Maria, RS. *Anais... Laboratório de Virologia – UFSM*, 175 p., p. 39-48, 1998.
- SCHERER, C.F.C; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KREUTZ, L.C.; DÜRR, J.W.; BRUM, L.P.; QUADROS, V.L.; LIMA, M. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no leite. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 22, p. 45-50, 2002.