

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
RODRIGO FELIPPIN

ATIVIDADE DE PATÓGENOS CAUSADORES DA BVD, NEOSPOROSE E IBR EM
REBANHOS LEITEIROS

Alfenas - MG

2016

RODRIGO FELIPPIN

ATIVIDADE DE PATÓGENOS CAUSADORES DA BVD, NEOSPOROSE E IBR EM
REBANHOS LEITEIROS

Dissertação apresentada à Universidade José do
Rosário Vellano, como parte das exigências do Curso
de Mestrado em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar
Animal para a obtenção do título de Mestre em
Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal.
Orientador: Prof.^o Dr Miller Pereira Palhão.

Alfenas – MG

2016

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Felippin, Rodrigo

Atividade de patógenos causadores da BVD, neosporose e IBR em rebanhos leiteiros. — Rodrigo Felippin.—Alfenas, 2016.
66 f.

Orientador: Prof. Dr. Miller Pereira Palhão
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal- Universidade
José do Rosário Vellano, Alfenas, 2016.

1. Sorologia 2. Sanidade 3. Agentes infecciosos I. Universidade
José do Rosário Vellano II. Título

CDU 636.034(043)



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "ATIVIDADE DE PATÓGENOS CAUSADORES DA BVD, NEOSPOROSE E IBR EM REBANHOS LEITEIROS".

Autor: Rodrigo Felippin

Orientador: Prof. Dr. Miller Pereira Palhão

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA – REPRODUÇÃO ANIMAL** pela Comissão Examinadora.



Prof. Dr. Miller Pereira Palhão
Orientador

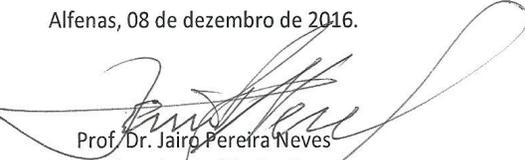


Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia



Prof. Dr. Gustavo Augusto de Andrade

Alfenas, 08 de dezembro de 2016.



Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Mestrado em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

DEDICO

A minha querida mãe, Mônica que sem dúvida alguma teve um papel fundamental na minha educação e na minha vida, sempre trabalhando muito para criar e educar a mim e meu irmão, minha eterna gratidão por acreditar e investir em mim, muito obrigado por tudo!

Ao meu pai pela ajuda nestes anos de graduação e pós-graduação.

A minha noiva Jacqueline pela paciência e ajuda durante tantos anos e em especial ao meu filho Fabrício que apesar de estarmos longe sempre está me apoiando.

A todos os meus familiares que de certa forma contribuíram para minha formação durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me oferecer a oportunidade de realizar um sonho que desde criança venho buscando.

Ao Coordenador do Curso de Mestrado o Professor Carlos Antônio de Carvalho Fernandes , pela oportunidade de ingressar no programa de mestrado.

À Universidade José do Rosário Vellano, pela acolhida durante este período.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

À FAPEMIG pelo suporte financeiro para realização deste estudo.

Ao meu Orientador Prof^o Dr. Miller Pereira Palhão, que acreditou em mim, compartilhando comigo suas ideias, conhecimentos tornando-se um grande amigo.

Ao meu Co-orientador Prof^o Dr. José Antônio Dias Garcia, por toda ajuda durante o período de pós-graduação, que sem duvida tornou-se um grande amigo.

Ao amigo M.V. Mestre. Rogério Rondinelli Nóbrega que além de me ensinar várias coisas desde os tempos de escola agrícola, até hoje continua me ajudando e dando conselhos, obrigado.

Ao amigo Prof^o Dr. Marcelo Simão Rosa, que acreditou em mim durante o período de escola agrícola e mesmo depois de tanto tempo continua me ajudando.

A todos os outros colegas de Mestrado, sem exceção, estarão com certeza nas lembranças e em especial M.V. Mestre. Regina Dias Zauli, pela ajuda durante o processamento das amostras.

A todos os meus professores, por todo o conhecimento passado durante esse período e sempre incentivando a estudar cada vez mais a correr atrás dos meus objetivos, muito obrigado pela paciência.

RESUMO

FELIPPIN, Rodrigo. **Atividade de Patógenos Causadores da BVD, Neosporose e IBR em Rebanhos Leiteiros**. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal)- Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2016.

O experimento foi conduzido com objetivo de avaliar o comportamento de doenças endêmicas, que afetam a sanidade dos rebanhos leiteiros, influenciando diretamente nos resultados produtivos e reprodutivos dos animais. Foram avaliadas amostras sanguíneas de 216 animais para BoHV-1 Ac, BVD Ac, BVD Ag e Neospora Caninum Ac, oriundos de 3 propriedades do Sul de Minas Gerais, que pertenciam as raças: Holandês, Jersey e Girolando. Os animais foram separados e distribuídos em grupos de acordo com a categoria, idade, dias em aberto e resultado da titulação dos testes. Com intuito de identificar a prevalência desses patógenos nas propriedades estudadas, a atividade destes agentes foi monitorada pela sorologia individual dos animais. Para o vírus da BVD 38,4% dos animais foram positivos, demonstrando efeito significativo ($P < 0,0001$) de propriedade, com variação da atividade viral desde valores altos como 58% e 44,8% até 9,7%. Pesquisando por fragmentos virais (antígeno), o que demonstra a presença do vírus da BVD, apenas um animal proveniente da propriedade com maior incidência de sorologias positivas foi diagnosticado positivo. Este foi posteriormente confirmado como permanentemente infectado (PI), condição em que o sistema imunológico identifica o vírus como partícula do próprio organismo, servindo de fonte de transmissão para o rebanho. Para o protozoário Neospora Caninum, 27,3% dos animais foram soropositivos e, novamente o efeito de propriedade ($P < 0,01$) revelou maiores prevalências (35% e 40%) nas mesmas propriedades com altos índices para BVD. A interpretação dos resultados obtidos para IBR, no entanto, deve ser considerada a partir do comportamento de um herpes vírus, onde, uma vez infectado, o animal permanece assim por toda a vida. Os índices encontrados ($P < 0,001$) de prevalências positivas variaram com resultados entre 85,0% a 51,6%. Concluímos que esses agentes infecciosos atuam na reprodução de cada propriedade, variando de acordo com o fluxo dos animais, concentração de animais e aspectos sanitários. E que a implantação de um programa sanitário baseado no diagnóstico sorológico, é viável e possível de ser incorporada na rotina

das propriedades. Para a BVD identificar a presença de animais PI é fundamental para manter a saúde do rebanho.

Palavras-chave: sorologia; sanidade ; agentes infecciosos.

ABSTRACT

FELIPPIN, Rodrigo. **Activity of BVD, Neosporosis and IBR Causing Pathogens in Dairy Herds**. 2016. 66f. Dissertation (Masters in Reproduction, Health and Animal Welfare) - José do Rosário Vellano University, Alfenas, 2016.

The experiment was conducted with the objective of evaluating the behavior of endemic diseases, which affect the sanity of dairy herds, directly influencing the productive and reproductive results of the animals. Blood samples of 216 animals were evaluated for BoHV-1 Ac, BVD Ac, BVD Ag and Neospora Caninum Ac, from 3 properties of the southern Minas Gerais, which belonged to the Dutch, Jersey and Girolando breeds. The animals were separated and distributed into groups according to the category, age, open days and test titration result. In order to identify the prevalence of these pathogens in the studied properties, the activity of these agents was monitored by the individual serology of the animals. For the BVD virus, 38.4% of the animals were positive, showing a significant effect ($P < 0.0001$), with variation in viral activity ranging from 58% and 44.8% to 9.7%. Searching for viral fragments (antigen), which demonstrates the presence of the BVD virus, only 1 animal from the property with a higher incidence of positive serologies was diagnosed positive. This animal was later confirmed as permanently infected (PI), a condition in which the immune system identifies the virus as a particle of the organism itself, serving as a source of transmission for the herd. For the protozoan Neospora Caninum, 27.3% of the animals were seropositive, and again the property effect ($P < 0.01$) showed higher prevalences (35% and 40%) in the same properties with high BVD indexes. The interpretation of the results obtained for IBR, however, should consider the behavior of a herpes virus, where, once infected, the animal remains infected for life. The indexes found ($P < 0.001$) of positive prevalence ranged from 85.0% to 51.6%. We conclude that these infectious agents act on the reproduction of each property, varying according to the flow of the animals, animal concentration and sanitary aspects. And that the implementation of a health program based on the serological diagnosis is feasible and possible to be incorporated into the routine of the properties. For the BVD to identify the presence of PI animals is fundamental to maintain the health of the herd.

Keywords: serology; health ; infectious agents.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Prevalência das doenças no Sul de Minas Gerais.....45
- Figura 2- Animal permanentemente infectado (PI) à esquerda e animal do grupo contemporâneo livre do vírus da BVD à direita.....54
- Figura 3- Animal suspeito de ser PI, coleta de material auricular para confirmação no teste de antígeno.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado da pesquisa dos agentes BVD, IBR e Neospora por propriedade.....	45
Tabela 2- Média da sorologia do protozoário Neospora <i>Caninum</i> , em relação a média da sorologia.....	47
Tabela 3- Porcentagem de bloqueio das amostras em relação ao vírus da IBR.....	49
Tabela 4- Índice de absorvância em relação à amostra para o vírus da BVD.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

CP	Citopatogênico
CSFV	Classical Swine Fever Virus
BVD	Diarréia Viral Bovina
DM	Doença das mucosas
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
Erns	Glicoproteína do envelope – induz a produção de anticorpos
E2	Glicoproteína do envelope – possui epítomos e é indutora de anticorpos neutralizantes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NCP	Não Citopatogênico
NEO	Neospora Caninum
OIE	Organização Internacional de Epizootia
PI	Persistentemente Infectado
NS3	Proteína que causa a citopatologia em células
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

SUMÁRIO

	Capítulo I.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	<i>Neospora Caninum</i>.....	14
2.2	Rinotraqueíte infecciosa bovina.....	17
2.2.1	Controle e prevenção da IBR.....	20
2.3	Diarréia viral bovina.....	21
3	TÉCNICA DE ELISA.....	25
	Capítulo II.....	38
	Atividade de patógenos causadores da BVD, neosporose e IBR em rebanhos leiteiros.....	38
	Resumo.....	39
	Abstract.....	40
	Introdução.....	41
	Materiais e Métodos.....	42
	Resultado e Conclusão.....	44
	Conclusão.....	55
	Referências.....	56

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por alimentos seguros e produzidos de forma sustentável tem direcionado a evolução da pecuária nacional. A agropecuária foi o setor do país que mais cresceu nos últimos anos. Com um aumento de 1,8% em relação a 2014, na média, o PIB do setor cresceu 3,6%, enquanto que o crescimento geral do PIB do país foi de 2,7% no período compreendido entre 2014 e 2015 (IBGE, 2015).

O estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de leite do Brasil com 9,37 bilhões de litros produzidos, o que corresponde a 26,6% da produção nacional (IBGE, 2014). A região estudada pertence a uma grande bacia leiteira do Sul de Minas Gerais, que contribui juntamente com a região sudeste com aproximadamente 18% da produção do estado (IBGE, 2014) e conseqüentemente a ação dos agentes infecciosos, pode impactar significativamente na economia da região.

A ineficiência reprodutiva pode ter efeitos prejudiciais sobre o sucesso econômico em propriedades de rebanhos leiteiros. Os prejuízos são acarretados por aumento dos dias em aberto (intervalo do último parto à nova concepção), resultando num maior intervalo de partos e um maior período entre dois picos de lactação consecutivos. Os prejuízos podem ser medidos por cada dia em aberto que o animal permanece no sistema após os 60 dias pós-parto.

Em sistema de produção a pasto, as fêmeas não gestantes permanecem consumindo e, muitas vezes os prejuízos passam despercebidos (WHITLOCK et al., 2008). Causas potenciais de infertilidade de bovinos incluem falhas na ovulação ou fertilização, morte embrionária e perda fetal. As etiologias das perdas de gestação em vacas podem ser divididas em duas categorias: infecciosas ou não infecciosas.

Entre os principais agentes infecciosos responsáveis por falhas reprodutivas em bovinos estão: *Neospora caninum*, Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1, relacionado a rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR) e Bovine viral diarrhea vírus (BVDv). Que causam infertilidade temporária, retorno ao cio, mortalidade

embrionária ou fetal, nascimento de bezerros fracos, rinotraqueíte, abortos no terço final da gestação entre outras.

O sistema adotado na maioria dos rebanhos leiteiros, não possui controle de entrada de animais, controle de fluxo de animais, quarentena, tendo limitações para realizar exames e ainda contato com a fauna selvagem. Portanto, favorece a disseminação de agentes infecciosos dentro dos rebanhos e são raras as propriedades onde não existem soroprevalência por alguns destes agentes.

Pelo valor individual de cada gestação e facilidade de disseminação dos patógenos, além de programas eficientes de imunização, o monitoramento da prevalência dos agentes é muito importante, para que as estratégias de controle sejam devidamente concebidas, implantadas e monitoradas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neospora Caninum

Neospora caninum é um protozoário intracelular, que acomete várias espécies, desde canídeos domésticos e selvagens, bovinos, equídeos (ANDREOTTI, 2010), até caprinos (DUBEY, 2003; VARASCHIN et al., 2012; MESQUITA et al., 2013). Este protozoário possui um eficiente poder de disseminação dentro do rebanho, chegando até 90% dos indivíduos (DUBEY et al., 2006).

Pertencente ao filo Apicomplexa, se assemelha ao *Toxoplasma gondii*, porém apresenta diferenças estruturais e antigênicas (DUBEY et al., 1988). Antes de ser isolado pela primeira vez em cães com encefalomielite por Dubey et al. (1988), era confundido com *T. gondii*. Os Taquizoítos são cistos contendo bradizoítos e oocistos, que são os estágios infectantes da *N. caninum* (DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999). Os cistos possuem seletividade pelo sistema nervoso central (SNC), os taquizoítos já foram localizados em células de diversos órgãos de animais infectados.

A neosporose, figura hoje como uma das principais causas de perdas gestacionais em bovinos de todo o mundo, causando prejuízos econômicos na pecuária de corte e de leite (DUBEY e LINDSAY, 1996). A permanência de animais infectados tem sido estudada em diversos países da América do Norte, Europa, Ásia, África e Oceania (DUBEY, 1999). Na América do Sul foram notificados

rebanhos positivos na Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (MOORE, 2005). A prevalência de anticorpos anti - *N. caninum* pode ser muito alta, atingindo até a 100% em certos rebanhos (DUBEY; SCHARES, 2006).

Segundo Davison et al., 1999, a infecção vertical ou congênita, onde a mãe contamina o feto via transplacentária, é eleita a principal fonte de transmissão para os bovinos, enquanto que na horizontal a contaminação se dá pela ingestão de oocistos esporulados no ambiente, sendo considerada segunda forma infecção (DUBEY, 1999). Vários estudos têm buscado pontuar os fatores de risco que envolvem a contaminação dos bovinos pelo *N. caninum*. Dentre eles estão os relacionados ao manejo, a idade dos bovinos e a presença de hospedeiros definitivos na propriedade (CORBELLINI et al., 2006).

Alguns lugares no mundo computam perdas econômicas da ordem de 35 milhões de dólares por ano, como é o caso da Califórnia. Podendo chegar a 85 milhões para a indústria leiteira e 25 milhões de dólares para a produção de carne por ano na Austrália (ANDERSON et al., 2000). No Brasil, a *N. caninum* foi identificada a partir de 1999, em fetos abortados e através de levantamentos sorológicos de bovinos e cães de diferentes estados. Estudos recentes calculam perda anual de forma direta e indireta, 51,3 milhões na pecuária leiteira e 101,0 milhões de dólares no setor de corte (REICHEL et al., 2013).

Os hospedeiros definitivos para *N. caninum* são os cães (*Canis familiaris*) Mcallister et al., 1998; o coioete (*Canis latrans*) Gondin et al., 2004; o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) King et al., 2010 e o lobo-cinzento (*Canis lúpus*) Dubey et al., 2011. O cão e o coioete são os únicos hospedeiros definitivos, no qual ocorre o desenvolvimento sexual do protozoário resultando na contaminação do ambiente pela eliminação de oocistos nas fezes (GONDIM et al., 2004).

O ciclo de vida é composto por três estágios: bradizoítos, taquizoítos e esporozoítos. Os taquizoítos e bradizoítos são encontrados nos hospedeiros intermediários, que ao ingerirem oocistos esporulados eliminados nas fezes pelo hospedeiro definitivo, acabam contaminando-se. Em certas ocasiões como prenhez e imunodeficiência, os bradizoítos podem se converter em taquizoítos, que acabam se proliferando assexuadamente e promovendo a infecção fetal ou causando lesões nos animais imunossuprimidos. Posteriormente ocorre a liberação dos esporozoítos na luz intestinal, que penetram nas células da parede e passam a ser chamados de taquizoítos e os outros se transformam em bradizoítos dentro dos

cistos de parede espessa, onde permanecem latentes em divisão lenta. Os cistos são ovais ou circulares, ficam alojados no SNC, na retina e em outros tecidos (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY, 2003).

Os métodos de diagnóstico da neosporose bovina podem ser realizados por técnicas que evidenciam a presença do parasito, como histologia, imunohistoquímica e amplificação dos genes (PCR), ou por técnicas que identificam a presença de anticorpos, como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), métodos imunoenzimáticos (ELISA) e soroaglutinação (JOURNEL e PITEL, 2001). O abortamento é a principal manifestação clínica da neosporose em um rebanho com vacas infectadas e pode ocorrer entre o terceiro e o nono mês de gestação (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991).

O abortamento causado pela neosporose é complexo e pouco compreendido, para que ocorra, basta um contato da vaca prenhe com o *N. caninum* ou a reativação de protozoários encistados em tecidos do hospedeiro, que foram adquiridos em exposição prévia.

Conseqüentemente, à parasitemia, ocorre a infecção da placenta e posteriormente do feto (DUBEY et al., 2006). A infestação do protozoário na placenta prejudica a oxigenação do feto e, promove a liberação de prostaglandinas e/ou citocinas inflamatórias. O feto reage com a liberação de hormônio adrenocorticotrófico, que estimula sua expulsão (DUBEY et al., 2006). Vários tecidos fetais apresentam pontos de necrose, além de encefalite e gliose no SNC, miosite e miocardite mononuclear (DUBEY e LINDSAY, 1996; WOUDA et al., 1997; CORBELLINI et al., 2002; SANTOS et al., 2011; VARASCHIN et al., 2012).

Cañon-Franco et al. (2003) e Aguiar (2004), em dois estudos realizados em um mesmo município do Estado de Rondônia, encontraram valores de prevalência de 8,3% e 12,6%, respectivamente, para a região urbana e rural. Estes dados indicam que no meio rural as fontes de infecção para os cães como ingestão de placenta e fetos contaminados, bem como a possibilidade de caça e de ingestão de cistos teciduais em possíveis hospedeiros intermediários, parece ser importante na epidemiologia e manutenção do *N. caninum* nesse ambiente. Sendo assim, devemos evitar ao máximo o contato dos cães com essas fontes de contágio e também com os bovinos, realizar exames periodicamente nos animais do rebanho e de posse dos resultados, indicar o manejo correto desses indivíduos, visando o controle e erradicação da doença no rebanho.

2.2 Herpesvírus Bovino tipo 1

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) pertencente à família Hesperiviridae e considerado um dos principais patógenos causadores de abortos em bovinos (KUNRATH et al., 2004). O Herpesvírus bovino tipo 1, pode ser dividido em três genótipos diferentes: Sendo o BoHV-1.1, associado à doenças respiratórias como a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e casos de aborto, o BoHV-1.2a, causa manifestações clínicas no trato genital, como a Vulvovaginite Pustular Infecciosa (VPI), Balanopostite Pustular Infecciosa (BPI), aborto e infecções no trato respiratório e por último temos o BoHV-1.2b incomum no Brasil, porém provoca todos os sinais que os demais, exceto aborto até o momento (FRANCO e ROECHE, 2007).

Desse modo, tanto a forma respiratória quanto a genital do HVB tipo 1 podem causar abortos e morte fetal. Outra espécie distinta de Herpesvírus Bovino é o tipo BoHV - 5, apontado como principal agente nos casos fatais de meningoencefalite em bovinos jovens (OLDONI et al.,2004). De acordo com Oldoni et al., (2004), o BoHV - 5 é geneticamente e antigenicamente relacionado com o BVH-1, contudo algumas diferenças antigênicas são detectadas entre as proteínas de envelope destes vírus (glicoproteínas C). Mesmo com as diferenças e técnicas sorológicas tradicionais, a maioria dos anticorpos monoclonais são incapazes de distinguir entre os vírus BoHV-1 e BoHV-5.

Uma característica relevante para todos os herpesvírus é a capacidade de permanecer latente, por tempo indeterminado em seu hospedeiro após a infecção. Os locais de latência dependem do tipo do herpesvírus e espécie animal acometida. Na subfamília Alphaherpesviridae a latência ocorre nos gânglios (THIRE; DUBUISSON; PASTORET, 1986), durante esse período não há síntese de proteínas virais, podendo ocorrer um decréscimo na titulação de anticorpos neutralizantes (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982). Já na reativação o BoHV-1, o vírus transportado dos gânglios periféricos através dos nervos para o foco primário da infecção, havendo assim, a replicação e eliminação viral (DENNET; BARASA; JOHNSON,1976).

Em vacas gestantes, ao entrar em contato com as mucosas respiratória ou genital, o vírus dá início ao processo de multiplicação e disseminação por meio dos leucócitos infectados. Atingindo a carúncula uterina, o vírus ultrapassa o trofoblasto e chega ao interstício da vilosidade, onde infecta o endotélio e mesênquima (SCHLAFER; MILLER, 2007b). Desta forma, o aborto pode ocorrer tanto pela exposição inicial ao vírus, quanto pela reativação do vírus latente ou pela vacinação de vacas prenhes com vacina de vírus vivo (CROOK et al., 2012).

Os índices de aborto pelo BoHV-1 podem chegar a 25% no rebanho, que são causados por lesões necróticas no feto e na placenta, provocando extensas lesões vasculares, pulmonares, hepáticas e nervosas. O aborto ocorre entre 3 e 6 semanas após a infecção e a expulsão do feto por volta de 3 a 5 dias após a morte fetal (WOUTERS, 2006). Geralmente as lesões macroscópicas estão ausentes ou mascaradas pela autólise e quando visíveis incluem focos de 1-3 mm sob a cápsula do fígado e raramente sob a superfície do pulmão, podem ser encontrados focos de hemorragia peri-renal e na junção corticomedular do rim (SCHLAFER; MILLER, 2007b).

As lesões microscópicas ocorrem na forma de necrose em vários tecidos, sendo mais evidentes no fígado (CROOK et al., 2012; KENNEDY; RICHARDS, 1964). Também pode ocorrer uma proliferação de reticulócitos na região portal do fígado (KENNEDY; RICHARDS, 1964), infiltrados de linfócitos e plasmócitos circundando as áreas de necrose são descritos (CROOK et al., 2012), outros órgãos acometidos são o baço, timo (KENNEDY; RICHARDS, 1964), linfonodos (ANTONIASSI et al., 2007; KENNEDY; RICHARDS, 1964), rim, placenta (ANTONIASSI et al., 2007) e pulmão (ANTONIASSI et al., 2007; CROOK et al., 2012). Segundo Crook et al. (2012) lesões placentárias nem sempre estão presentes.

A doença causada pelo BoHV-5 é caracterizada como uma meningoencefalite não purulenta que afeta normalmente bovinos jovens (animais até oito meses de idade) (SCHUDEL et al., 1986; RISSI et al., 2007), mas pode também acometer, ocasionalmente, animais mais velhos, provocando uma doença de baixa morbidade e alta mortalidade (D'ARCE et al., 2002).

Bovinos de todas as idades e raças são susceptíveis à infecção pelo BoHV-1, no entanto, geralmente manifesta-se em animais acima de seis meses de idade e isto deve-se, provavelmente, à presença de anticorpos maternos em animais mais novos, podendo atenuar a gravidade da infecção (DONKERSGOED e BABIUK, 1991). Surtos de IBR são mais frequentemente observados em animais jovens e geralmente associados a situações de estresse e aglomeração de animais, incluindo eventos de transporte e confinamento (RIET-CORREA et al., 1996). O curso da doença é rápido e com recuperação clínica em até dez dias, quando não acometidos por infecções bacterianas secundárias graves ou outras infecções virais associadas (ENGELS e ACKERMANN, 1996; PIDONE et al., 1999).

Segundo estudos realizados por Boelaert et al. (2005) e Woodbine et al. (2009) em plantéis ingleses, algumas características como o constante ingresso de bovinos de diferentes origens, a presença de animais mais velhos, a aptidão leiteira e o maior número de cabeças por rebanho são fatores de risco para a ocorrência de BoHV-1.

O diagnóstico clínico nos distúrbios reprodutivos é quase impossível, devendo ser diferenciado de outras causas infecciosas ou não infecciosas. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por técnicas sorológicas como a de soroneutralização e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Contudo, estes testes não permitem identificar animais portadores do vírus em estágio de latência, podendo os mesmos apresentar baixa titulação de anticorpos. Também é possível diferenciar títulos oriundos de infecção por exposição vacinal ou natural (TAKIUCHI; ALFIERI, 2001).

Por isso, técnicas com maior especificidade têm sido utilizadas, como a PCR que possibilita a detecção de partículas virais não infectantes no exame ante-mortem (HAYDEN et al., 1991) e a imuno-histoquímica utilizada quando os tecidos fetais estão disponíveis. Recentemente Oldoni et al. (2004) desenvolveram anticorpos monoclonais para marcação imuno-histoquímica, que reagem especificamente com BoHV-5 e alguns com marcação cruzada para BoHV-1, como por exemplo, os clones 4E4, tornando-se importante para o diagnóstico do herpesvírus bovino.

2.2.1 Controle e Prevenção

De acordo com Radostits et al. (2007), ações como manejo sanitário e nutricional adequados, desinfecção periódica das instalações, controle de pragas e imunização dos animais, dificultam a disseminação viral dentro do rebanho. A vacinação é recomendada em locais onde a infecção por herpesvírus é endêmica e em propriedades onde haja condições favoráveis para a transmissão viral. Nesses casos, a erradicação da enfermidade é economicamente inviável, devido ao alto custo envolvido no descarte de animais, e diante desse cenário a imunização dos animais torna-se uma maneira eficaz de diminuir as perdas econômicas advindas da manifestação clínica da doença (PATEL, 2005).

No Brasil, a imunização é permitida apenas com vacinas inativas (DEL FAVA, 2001). As vacinas inativadas são capazes de minimizar a manifestação dos sinais clínicos e reduzir a excreção viral, entretanto não foram efetivas na prevenção da primoinfecção em bezerros amamentados com o colostro de vacas imunizadas durante a gestação (MOREIRA et al., 2001). Segundo Silva et al. (2007), há necessidade de reavaliação dos critérios para o licenciamento e a importação de vacinas contra BoHV-1, já que as seis vacinas comerciais testadas no estudo falharam ao induzir uma resposta imunológica adequada.

Cilento et al. (2011) produziu uma vacina inativada contra BoHV-1 que induziu níveis de anticorpos de moderados a altos tanto na mucosa quanto no compartimento sistêmico. Weiss et al. (2010) testou a vacinação intravaginal, que se mostrou efetiva na redução da severidade e na duração da sintomatologia clínica, bem como no período de excreção viral após o desafio. As vacinas recombinantes podem ser uma alternativa em locais que precisam diminuir a ocorrência da infecção para, posterior erradicação do agente viral.

Esse tipo de imunógeno permite a diferenciação entre cepas vacinais e não vacinais, através de um teste ELISA que diagnosticarão anticorpos contra uma glicoproteína presentes somente nos isolados de campo. Franco (2002) desenvolveu uma vacina recombinante (gE) que apresentou atenuação, imunogenicidade e efeito protetor frente ao desafio com vírus homólogo. No entanto, esse tipo de vacina necessita de estudos mais aprimorados.

Antes de propor um esquema de vacinação os veterinários devem levar em consideração alguns fatores, como análise de custo financeiro, levando-se em

conta o preço cobrado pelo produto biológico, os custos relativos ao manejo, diagnóstico diferencial excluindo outros agentes de problemas reprodutivos no rebanho e por último uma avaliação rigorosa do manejo implementado no rebanho, de forma a minimizar o estresse e a evitar a expressão de herpesvírus latentes. O estresse será sempre um complicador, e a utilização apenas de vacinas pode não contornar determinadas situações de surtos causados por herpesvírus (MELO, 2012; UnB, Brasília; informação pessoal).

Melo et al. (2004) observaram coinfeções por BoHV-1, vírus da diarreia bovina a vírus (BVDV) e *Neospora caninum*. A porcentagem de amostras positivas foi de 4,41% para *N. caninum*/BoHV-1, 23,1 1% para BoHV-1/VBVD e 8,41% para *N. caninum*/BoHV-1/BVDV. Esses resultados demonstraram a dificuldade para a tomada de decisão em relação ao diagnóstico correto para os agentes abortivos dos animais, pois, quando isso é realizado de forma errada, acarretam em prejuízos ao produtor. Contudo, a eficiência de produtos biológicos geralmente é questionada, quando, muitas vezes, esses são mal prescritos ou mal administrados. Por fim, observou-se neste trabalho que as vacas continuaram a abortando mesmo depois de terem sido vacinadas contra BVDV e BoHV-1, quando esses rebanhos apresentavam altos títulos para *N. caninum* (FINO, et al., 2012).

2.3 Vírus da diarreia viral bovina (BVDv)

Em 1946 Olafson e seus colaboradores nos Estados Unidos e Childs no Canadá, descreveram simultaneamente uma enfermidade diarreica com alta morbidade, baixa mortalidade e de etiologia não definida. Pela grave leucopenia observada nos animais afetados, concluíram que se tratava de enfermidade com etiologia viral e assim foi denominada de Diarreia Viral Bovina (RAMSEY; CHIVERS, 1953). Algum tempo depois eles descreveram uma doença idêntica, porém mais grave, onde foram observadas lesões ulcerativas nas mucosas e diarreia com fezes aquosas, às vezes sanguinolentas, que acabou recebendo o nome de Doença das Mucosas (DM), as lesões do trato gastrointestinal verificadas na DM são muito mais graves do que as observadas na BVD.

A DM afeta apenas alguns animais do rebanho, apresentando índices mais elevados de casos fatais (RAMSEY; CHIVERS, 1953). No início da década de 1960, estudos realizados por Gillespie et al., (1960), demonstraram que os agentes

virais isolados de animais com a BVD e DM eram os mesmos com pequenas alterações. Este agente etiológico foi nomeado como Vírus da Diarreia Viral Bovina / Doença das mucosas (GOENS, 2002). Ainda na década de 1960 foi demonstrado que o BVDv estava antigenicamente relacionado com o vírus da peste suína clássica (CSFV – “Classical Swine Fever Virus”) e a doença das Fronteiras (BDV – “Border Disease Virus”) em ovinos também estava relacionado com o BVD e CSFV (PLANT et al., 1973), esse grupo de viroses foi denominado de Pestivírus (HORZINEK, 1973).

Depois da descoberta do complexo BVD / DM, a investigação sobre a patogenia levou a estudos com infecções experimentais em vacas prenhes e bezerros. Em virtude desses experimentos, abortos e distúrbios teratogênicos foram encontrados e associados a infecções intrauterinas com o BVD (MALMQUIST, 1968). Esses experimentos também proporcionaram a descoberta de que bezerros infectados ainda no útero nasciam fracos e com sobrevivência de alguns meses, apresentando sintomatologia crônica, já conhecida como DM.

Esses animais foram identificados como persistentemente infectados (PI) com o BVD, alguns pesquisadores acreditavam que animais PI, tinham uma deficiência imunológica que não os faziam produzir anticorpos detectáveis contra o vírus (JOHNSON e MUSCOPLAT, 1973).

Logo constataram que a imunodeficiência estava só relacionada com o BVD, por que os mesmos animais foram capazes de produzir anticorpos para outros agentes infecciosos, tais como o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Parainfluenza 3 e a *Pasteurella hemolytica* (McCLURKIN et al., 1984). Em 2001 a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) adicionou a BVD, à sua lista de doenças, tanto devido à sua propagação em nível internacional como à sua importância para o comércio de animais, demonstrando um forte sinal que a BVD estava se tornando uma prioridade internacional (LINDBERG et al., 2006).

A alta frequência de mutações, a propensão à recombinação e a pressão seletiva pela resposta imune, estimulada por infecções naturais ou por vacinação, tem levado ao surgimento de uma grande variedade de variantes genéticas e antigênicas do BVD. Essas variações permitem classificá-los em dois genótipos: BVDV-1, associado às formas clássicas da diarreia viral bovina / doença das mucosas e que representam a maioria dos vírus vacinais e das estirpes referência, e BVDV-2 que foram inicialmente identificados em surtos de BVD aguda severa e

doença hemorrágica na América do Norte (PELLERIN et al., 1994). Todos os pestivírus são antigenicamente relacionados, embora a reatividade sorológica cruzada entre as espécies BVDV-1 e BVDV-2, seja baixa, e isto apresenta implicações importantes para o diagnóstico e eficácia de vacinas (RIDPATH e FLORES, 2007).

O vírus entra no organismo pelas vias digestivas e aéreas ou através de mucosas do aparelho reprodutor (LIEBERMAN, 1988), o epitélio do trato respiratório superior é porta de entrada preferencial do vírus, orofaringe e o tecido linfóide regional parecem ser os sítios primários de replicação após a infecção oronasal (RIDPATH e FLORES, 2007). As manifestações são agrupadas em três formas principais: aguda leve (gastroentérica e respiratória), aguda severa (gastroentérica, respiratória e hemorrágica) e doença das mucosas (RIDPATH e FLORES, 2007). De acordo com Evermann e Barrington (2005), 70 a 90% das infecções são em animais imunocompetentes e soronegativos.

A forma aguda leve é definida pelas manifestações clínicas, em bovinos imunocompetentes que não PI (LIEBLER-TENORIO, 2005). Onde os animais apresentam inapetência, depressão, febre, diarreia, leucopenia transitória e a duração dependem do tempo de viremia, virulência do vírus infectante e presença de infecções secundárias (RADOSTITS et al., 2000). A doença é auto limitante e transitória, leve ou por vezes inaparente, com alta morbidade 30 a 90% e mortalidade muito baixa ou ausente (FLORES et al., 2005; OIE 2008).

Na forma aguda severa, a pneumonia é a doença mais frequente (RADOSTITS et al., 2000), nas infecções severas podem ocorrer à síndrome hemorrágica, diarreia sanguinolenta, hemorragias nas superfícies mucosas da boca e vulva, hifema, pirexia (41-42°C), desidratação, leucopenia e morte (GROOMS et al., 2006). Acreditava-se que o BVDV 2 era o mais patogênico, mas hoje sabemos que ambos causam infecções agudas severas (HOUE, 2003). Em muitos rebanhos onde a infecção é endêmica, falhas reprodutivas representam os sinais mais evidentes e em alguns casos os únicos da presença da doença (BAKER, 1995).

Após contaminação das fêmeas prenhes, o vírus é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto e suas consequências serão determinadas pela fase em que a gestação se encontra (FLORES et al., 2005; KAHN, 2007), biótipo (CP/NCP) e estirpe do vírus (FLORES et al., 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005). Quando ocorre a primo infecção em novilhas logo após inseminação artificial ou monta

natural, acontece queda nas taxas de concepção ocasionada pela dificuldade de fixação do embrião ao útero, ou mesmo que haja fixação pode haver morte embrionária, perda precoce de gestação com o embrião reabsorvido (EVERMANN; BARRINGTON, 2005).

Fêmeas não imunes podem ter o feto invadido dependendo da fase de desenvolvimento pode ocorrer atraso no crescimento fetal, morte fetal, abortos, má formação no sistema nervoso central, deficiências oculares, ou então o nascimento bezerros infectados para toda a vida chamados PI (ANDREWS et al., 2004; FULTON et al., 2003; GROOMS et al., 2006, LIEBLER-TENORIO, 2005). O feto contaminado no último terço de gestação (após os 150 dias) tem resposta imunológica e eliminação do vírus pelo feto (BROCK, 2004; OIE, 2008), o animal nasce portador de anticorpos, mas livre do vírus. Vacas prenhes ao contrair o vírus com uma cepa não citopatogênica antes da formação do sistema imune, entre 45 a 125 dias de gestação, podem originar bezerros PI.

O feto não desenvolve anticorpos contra o vírus e ainda o reconhece como parte do seu organismo, esses bezerros aparentemente saudáveis são na verdade uma grande fonte de infecção para o rebanho, despejando diariamente grandes quantidades do vírus em secreções e excreções no ambiente (DEREGT; LOEWEN, 1995; FLORES, 2003; KAHN, 2007). Por isso os animais PI ficam susceptíveis a contraírem outras doenças, como a doença das mucosas se forem acometidos simultaneamente por cepa citopatogênica homóloga (FLORES et al., 2005; KAHN, 2007), possuem tempo de vida reduzido e estimado entre 6 meses até 2 anos de idade no máximo.

Dados demonstram mortalidade superior a 50% nos 12 primeiros meses de vida e menos de 10% das novilhas PI chegam a fase reprodutiva (GROOMS et al., 2006; LIEBLER-TENORIO, 2005). Já a doença das mucosas é tida como uma enfermidade gastroentérica fatal, desencadeada após um animal PI sofrer infecção concomitante com BVDV- CP antigenicamente semelhante.

O BVDV-CP geralmente se origina do BVDV-NCP do próprio animal através de mutações, assim os animais que desenvolverem a DM, possuíram os dois vírus (NCP e CP) estão presentes (RIDPATH; FLORES, 2007). Alguns pesquisadores falam que a prevalência dos bovinos PI atinge entre 0,5% e 2% da população geral de bovinos (FLORES et al., 2005; GROOMS et al., 2006; HOUE, 1999; OIE, 2008).

A vasta gama de sinais clínicos não patognomônicos, presentes em outras doenças infecciosas e parasitárias dificulta o diagnóstico definitivo da BVD (SANDVIK, 1999).

Os métodos diagnósticos são classificados em indiretos, quando pesquisam anticorpos contra o vírus e diretos quando a detecção é do vírus, antígenos ou ácidos nucleicos virais (RIDPATH e FLORES, 2007). O teste indireto geralmente é feito pela técnica de virusneutralização (VN) ou ELISA “(enzyme-linked immunosorbent assay)” indireto. Segundo Schuch (2006), animais infectados recentemente soroconvertem em 14-20 dias após a detecção inicial, assim são necessárias amostras pareadas para confirmação.

3 TÉCNICA DE ELISA INDIRETO

O teste de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas, que atuam sobre substrato cromógeno revelando o resultado do teste por alteração na coloração da solução. A enzima mais comumente utilizada nestas provas é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada (H_2O_2) em H_2O mais O_2 .

O resultado pode ser lido de maneira subjetiva por comparação da coloração das amostras com os padrões positivos e negativos previamente definidos, ou de maneira objetiva através dos padrões de absorbância dos feixes de luz que cruzam a solução em leitoras adaptadas. O ELISA é utilizado para a detecção de pequenas quantidades de antígenos/anticorpos, que geralmente não são detectáveis pelos métodos convencionais. Tem como característica a alta sensibilidade e especificidade, e rapidez na sua execução. O que permite o estudo de grandes populações em curto espaço de tempo, e em laboratórios de rotina (ENGVAL e PERLMANN, 1971).

Existem vários modelos de testes de ELISA, em sua forma mais simples chamada ELISA indireto, um antígeno aderido a um suporte sólido (placa de ELISA) é preparado, a seguir coloca-se sobre este os soros em teste, na busca de anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá à formação da ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectado pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde

se busca detectar os anticorpos do animal, a qual é ligada à peroxidase. Este anticorpo anti-IgG, ligado à enzima denomina-se conjugado. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima (isto é, H₂O₂ dissolvida em uma substância química que dá uma reação colorida quando H₂O₂ é desdobrada). No orifício onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentam uma coloração variável dependendo do substrato (INFOESCOLA, 2015).

O método de direto ou captura, é indicado para identificação de antígenos, e este antígeno fica entre dois anticorpos. Assim, um anticorpo primário específico ao antígeno é adsorvido no poço da microplaca, em seguida o antígeno na solução problema é adicionado. Depois o segundo anticorpo específico ao antígeno é marcado com uma enzima e adicionado, está enzima que reage com o substrato fazendo com que o cromógeno mude de cor. A presença de cor nos poços indica a presença do antígeno, e os poços que não mudarem de cor indica a ausência do antígeno em questão (INFOESCOLA, 2015).

O teste de ELISA direto identifica a proteína viral, apresentando como vantagem a conclusão dos resultados em poucas horas, mas a dependência de kits comerciais importados gera problemas relacionados ao custo e disponibilidade do produto em tempo (PILZ et al., 2005). As amostras de eleição são o soro e biópsia de pele do animal (DUBOVI, 2013). A desvantagem do teste, dependente do antígeno ser capturado por um anticorpo monoclonal específico, anticorpos policlonais contra o vírus que estão na amostra teste, podem bloquear a detecção do antígeno. Contudo, a possibilidade de falsos negativos deve ser sempre motivo de preocupação (DUBOVI, 2013).

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus 1 in trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 36-40, jan.1982.

AGUIAR, D.M. **Prevalência de anticorpos anti-neospora caninum, anti-brucella abortus e anti-leptospira spp em bovinos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia: estudo de possíveis fatores de risco.** 2004. 118 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ANDERSON, M.L.; ADRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, n 2, p. 417-431, jul. 2000.

ANDERSON, M.L. et al. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, California, v. 198, n.2, p.241-244, jan. 1991.

ANDREOTTI, R. et al. Association between seropositivity for Neospora caninum and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 19, n 2, p.119-123, abr./jun. 2010.

ANDREWS, A.H. et al. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle.** 2. ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2004. p. 853-857.

ANTONIASSI N.A.B. et al. Causas de aborto bovino diagnosticadas no setor de patologia veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesq. Vet. Bras.**, Porto Alegre, v. 33, n 2, p. 155-160, fev. 2013.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 425-445, nov. 1995.

BARR C.B. et al. Neospora-like protozoal infections with bovine abortion. **Vet. Path.**, v. 28, n 2, p.110-16, mar. 1991.

BOELAERT, F. et al. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity, **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 69, n. 3/4, p. 285-295, nov. 2005.

BROCK, K.V. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, United States, v. 20, n. 1, p. 171-180, dec. 2004.

CAÑÓN-FRANCO, W.A. et al. Prevalence of antibodies anti-Neospora caninum in dogs from Amazon, Brazil. **Vet. Parasitol**, v. 115, n. 1, p. 71-74, jul. 2003.

CHILDS, T. X. Disease in cattle - Saskatchewan. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Canada, v. 10, n 11, p. 316-319, nov. 1946.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 195-202, apr. 2002.

CORBELLINI, L.G. et al. Herd-level risk factors for neospora caninum seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 74, n. 2-3, p. 130-141, jan. 2006.

CROOK T. et al. Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of haematogenous spread within the fetus in natural cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n 4, p.662-670, may 2012.

D'ARCE R.C.F. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n.4, p.315-324, sept. 2002.

DAVISON, H.C.; OTTER, O.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *N. caninum* in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, Liverpool, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, oct. 1999.

DEL FAVA C. **Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte, infectados e não infectados pelo herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1)**. 2001. 127f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DENNETT, D.P.; BARASA, J.O.; JOHNSON, R.H. Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle. **Res. Vet. Sci.**, v.20, n 1, p.77-83, jan. 1976.

DEREGT, D.; LOEWEN, K. G. Bovine viral diarrhea virus - biotypes and disease. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 36, n. 6, p. 371-378, jan. 1995.

DONKERSGOED, J.V.; BABIUK, L.A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, Canada, v. 86, n. 1, p. 86-94. 1991.

DUBEY, J.P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.192, n 9, p.1269-1285, may 1988.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of neospora caninum and neosporosis. **Vet Parasitol**, Beltsville , v.67, n 1-2, p.1-59, dec. 1996.

DUBEY, J.P. Recent advances in neospora and neosporosis. **Vet. Parasitol.** ,v. 84, n. 3-4, p. 349-367, aug. 1999.

DUBEY, J. P. Review of neospora caninum and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 41, n. 1, p. 1-16, jan. 2003.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 134, n. 4, p. 267- 289, may 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, aug. 2006.

DUBEY, J.P., SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. **Vet. Parasitol.**, v.180, n 1-2, p. 90–108, aug. 2011.

DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 8-13, jan. 2013.

EVERMANN, J. F.; BARRINGTON, G. M. Clinical features. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. Cap. 6, p. 105-119.

ENGELS, M., ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, Zürich, v. 53, n. 1- 2, p. 3-15, nov. 1996.

FINO, T. C. M., MELO, C. B., RAMOS, A. F., & LEITE, R. C. Infecções por herpesvirus tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.122–127, 2012

FLORES, E. F. et al. Infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n.3, p.125-134, jul. 2005.

FLORES, E.F. Vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Biológico**, São Paulo, v.65, n. 1-2, p. 3-9, jul. 2003.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae,. In: FLORES E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria : Editora UFSM, 2007. p.433-488.

FRANCO AC. A Brazilian glycoprotein e negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.22, n 4, p.135-140, oct / dez. 2002.

FULTON, R. W. et al. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programs. **Biologicals**, London, v.31, n. 2, p. 89-95, jun. 2003.

GILLESPIE, J. H.; BAKER, J. A.; McENTEE, K. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. **Cornell Veterinarian**, United States, v. 50, p. 73-79, jan. 1960.

GOENS, S.D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n.12, p.946-954, dec. 2002.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of neospora caninum. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 159-161, mar. 2004.

GROOMS, D, BAKER, J.C.; AMES, T.R. Doenças causadas pelo vírus da diarréia viral bovina. In: SMITH, BP. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 707-714

HAYDEN, J.D. et al. The promises and pitfalls of PCR. **Reviews in Medical Microbiology**, v.22, p.129-137, apr. 1991.

HORZINEK, M.C. The structure of togaviruses. Progress in Medical **Virology**, v. 16, p. 109– 156, 1973.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 137-143, jun. 2003.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 64, n. 2-3, p. 89-107, jan. 1999.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.com.br>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

INFOESCOLA. Disponível em:< <http://www.infoescola.com/medicina/teste-elisa>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

JOURNEL, C.; PITEL, P.H. Diagnóstico da neosporose em bovinos. **H Vet**, Porto Alegre, n.122, p.70-72, 2001.

JOHNSON, D.W.; MUSCOPLAT, C.C. Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 9, p. 1139–1141, sept. 1973.

KAHN, C.M. **Manual Merck de Veterinaria**. 6.ed. Barcelona, España: Editorial Océano, 2007. v.1, p. 215-218.

KENNEDY, P.C.; RICHARDS, W. P. C. The pathology of abortion caused by the vírus of infectious bovine rhinotracheitis. **Pathology Veterinary**, California, v.2, n. 1, p. 7-17. jan. 1964.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of neospora caninum. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 945-950, aug. 2010.

KUNRATH C.F. et al. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n 6, p. 1877-1883, nov / dez. 2004.

LIEBERMAM, H. Infecções por pestevírus. In: BEER, J. (org.). **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. p. 89-93.

LIEBLER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 7, p. 121-143.

LINDBERG, A. et al. The control of bovine viral diarrhea virus in Europe: today and in the future. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, France, v. 25, n. 3, p. 961-979, déc. 2006.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that dog is a definitive host for neospora caninum. **Vet Parasitol**, v.82, n. 4, p.327-333, may 1999.

MALMQUIST, W.A. Bovine viral diarrhea-mucosal disease: etiology, pathogenesis, and applied immunity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 152, n. 6, p. 763–768, feb.1968.

MCCLURKIN, A.W.; et al. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v. 48, n. 2, p. 156–161, apr. 1984.

McALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of neospora caninum. **J Parasitol**, Laramie, v.28, n. 9, p.1473-1478, sept. 1998.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P. Infection by neospora caninum associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, jan. 2004.

MOREIRA, S. P. G. et al. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** São Paulo, v. 38, n. 3, p. 127-130, jan. 2001.

MESQUITA L.P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with neospora caninum. **Vet. Parasitol.**, Lavras, v.196, n. 3 - 4, p.327-332, sept. 2013.

MOORE, D.P. et al. Immune response to neospora caninum in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. **Vet. Parasitol.**, v.130, n. 1 - 2, p.29-39. jun. 2005.

OIE – World Organization for Animal Health. Chapter 2.4.8. – Bovine Viral Diarrhoea. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, p. 698-711, 2008. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2015.

OLAFSON P.; MACCALLUM A.D.; FOX A. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Vet.**, New York, v. 36, n. 3, p.205-213, jul. 1946.

OLDONI, I. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, 2004. No prelo.

PATEL JR, Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. **Vet J**, v.169, n. 3, p.404-416, may. 2005.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, United States, v. 203, n. 2, p. 260-268, sept. 1994.

PILZ, D.; ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarréia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sangüíneo, artificialmente contaminados. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 219- 228, abr./jun. 2005.

PLANT, J.W. et al. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. **Veterinary Research**, v. 92, n. 17, p. 455, apr. 1973.

PIDONE, C.L et al. Herpesvirus bovinos 1 y 5. **Analecta Veterinaria**, Buenos Aires, v. 9, n. 1-2, p. 40-50. jun. 1999.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C. ; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10th ed. Edinburgh : Saunders-Elsevier, 2007. 2156 p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Veterinary Medicine**: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9. ed. London, UK: W. B. Saunders, 2000. p. 1085-1105.

RAMSEY, F.; CHIVERS, W. Mucosal disease of cattle. **North American Veterinary**, v. 34, p. 629-633, 1953.

REICHEL, M P. et al. What is the global economic impact of neospora caninum in cattle:the billion dollar question. **Int J Parasitol**, v.43, n.2, p.133–142, feb. 2013.

RIDPATH, J.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F (org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. Cap. 22, p. 564-591.

RIET-CORREA, F. et al. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 323-332, maio 1996.

RISSI, D.R. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7. p. 251-260. jul. 2007

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, jan.1999.

SANTOS, D.S. et al. Neospora caninum in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** , Jaboticabal, v. 20, n. 4, p.281–288, nov. 2011.

SCHLAFER D.H.; MILLER R.B. Female genital system. In: Maxie,M.G. (Ed). **Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals**. Philadelphia: Elsevier, 2007b. v. 3.

SCHUCH, L.F.D. Diarréia viral bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. (Org.) **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Varela, 2006. v. 1, p.64-71.

SCHUDEL A.A. et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. **Zentralblatt für Veterinärmedizin B**, v. 33, n. 1 - 10, p.303-310, jan.1986.

SILVA M.S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesq. Vet. Bras.** Santa Maria , v.27, n.10, p.403-408, out. 2007.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A. A.Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: ciências agrárias**. Londrina, v.22, n.2, p.203-209, dez. 2001.

THIRE, E; DUBUISSON, J; PASTORET, P, P. Pathogenesis, latency and reactivation of infection by herpes virus. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Epizooties**, Paris, v. 5, p. 809 – 819, 1986.

VARASCHIN, M. S. et al. Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 50, n. 1, p. 63-67, jan. 2012.

WHITLOCK, B.K.; MAXWELL, H.S. Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle. **Theriogenology** , v.70, n 3 p.550–559, aug. 2008.

WOUDA, W. et al. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **J Vet Diagn Invest, Netherlands**, v.9, n. 2, p.180-185, apr. 1997.

WOUTERS, F. Diarreia bovina a vírus: doença das mucosas. In: VARASCHIN, M. S. (Ed.). **Patologia especial das principais doenças transmissíveis na reprodução e bovinos**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 27-36.

WOODBINE, K. A et al. A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west. **BMC Vet Res**, England, v.5, p.5, jan. 2009.

CAPÍTULO II

Atividade de patógenos causadores da BVD, Neosporose e IBR em rebanhos leiteiros.

Rodrigo Felippin ¹; Inácio G. Júnior ³; José A. D. Garcia ^{2,3}; Carlos A. C. Fernandes ²; Miller P. Palhão ²

Universidade José do Rosário Vellano

Resumo- O experimento foi conduzido com objetivo de avaliar o comportamento de doenças endêmicas, que afetam a sanidade dos rebanhos leiteiros, influenciando diretamente nos resultados produtivos e reprodutivos dos animais. Foram avaliadas amostras sanguíneas de 216 animais para BoHV-1 Ac, BVD Ac, BVD Ag e Neospora Caninum Ac, oriundos de 3 propriedades do Sul de Minas Gerais, que pertenciam as raças Holandês, Jersey e Girolando. Os animais foram separados e distribuídos em grupos de acordo com a categoria, idade, dias em aberto e resultado da titulação dos testes. Com intuito de identificar a prevalência desses patógenos nas propriedades estudadas, a atividade destes agentes foi monitorada pela sorologia individual dos animais. Para o vírus da BVD 38,4% dos animais foram positivos, demonstrando efeito significativo ($P < 0,0001$) de propriedade, com variação da atividade viral desde valores altos como 58% e 44,8% até 9,7%. Pesquisando por fragmentos virais (antígeno), o que demonstra a presença do vírus da BVD, apenas um animal proveniente da propriedade com maior incidência de sorologias positivas foi diagnosticado positivo. Este animal foi posteriormente confirmado como permanentemente infectado (PI), condição em que o sistema imunológico identifica o vírus como partícula do próprio organismo, servindo de fonte de transmissão para o rebanho. Para o protozoário Neospora Caninum, 27,3% dos animais foram soropositivos e, novamente o efeito de propriedade ($P < 0,01$) revelou maiores prevalências (35% e 40%) nas mesmas propriedades com altos índices para BVD. A interpretação dos resultados obtidos para IBR, no entanto, devemos considerar o comportamento de um herpes vírus, onde, uma vez infectado, o animal permanece assim por toda a vida. Os índices encontrados ($P < 0,001$) de prevalências positivas variaram com resultados entre 85,0% a 51,6%. Concluímos que esses agentes infecciosos atuam na reprodução de cada propriedade, variando de acordo com o fluxo dos animais, concentração de animais e aspectos sanitários. E que a implantação de um programa sanitário baseado no diagnóstico sorológico é viável e também possível de ser incorporado na rotina das propriedades. Para a BVD identificar a presença de animais PI é fundamental para manter a saúde do rebanho.

Termos para indexação: sorologia, sanidade, agentes Infecciosos

Activity of pathogens causing BVD, Neosporosis and IBR in dairy herds

Abstract- The experiment was conducted with the objective of evaluating the behavior of endemic diseases, which affect the sanity of dairy herds, directly influencing the productive and reproductive results of the animals. Blood samples of 216 animals were evaluated for BoHV-1 Ac, BVD Ac, BVD Ag and Neospora Caninum Ac, from 3 properties of the southern Minas Gerais, which belonged to the Dutch, Jersey and Girolando breeds. The animals were separated and distributed into groups according to the category, age, open days and test titration result. In order to identify the prevalence of these pathogens in the studied properties, the activity of these agents was monitored by the individual serology of the animals. For the BVD virus, 38.4% of the animals were positive, showing a significant effect ($P < 0.0001$), with variation in viral activity ranging from 58% and 44.8% to 9.7%. Searching for viral fragments (antigen), which demonstrates the presence of the BVD virus, only 1 animal from the property with a higher incidence of positive serologies was diagnosed positive. This animal was later confirmed as permanently infected (PI), a condition in which the immune system identifies the virus as a particle of the organism itself, serving as a source of transmission for the herd. For the protozoan Neospora Caninum, 27.3% of the animals were seropositive, and again the property effect ($P < 0.01$) showed higher prevalences (35% and 40%) in the same properties with high BVD indexes. The interpretation of the results obtained for IBR, however, should consider the behavior of a herpes virus, where, once infected, the animal remains infected for life. The indexes found ($P < 0.001$) of positive prevalence ranged from 85.0% to 51.6%. We conclude that these infectious agents act on the reproduction of each property, varying according to the flow of the animals, animal concentration and sanitary aspects. And that the implementation of a health program based on the serological diagnosis is feasible and possible to be incorporated into the routine of the properties. For the BVD to identify the presence of PI animals is fundamental to maintain the health of the herd.

Index terms: serology, health, infectious agents

Introdução

A crescente demanda mundial por alimentos seguros e produzidos de forma sustentável tem direcionado a evolução da pecuária nacional. A agropecuária foi o setor do país que mais cresceu nos últimos anos. Com um aumento de 1,8% em relação a 2014, na média, o PIB do setor cresceu 3,6%, enquanto que o crescimento geral do PIB do país foi de 2,7% no período compreendido entre 2014 e 2015 (IBGE, 2015). O estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de leite do Brasil, com aproximadamente 26,6% da produção nacional (IBGE, 2015).

Os índices reprodutivos de rebanhos leiteiros afetam diretamente o sucesso econômico das propriedades. O número de dias em aberto é medido pelo intervalo do último parto à nova concepção e a elevação deste indicador pode ser melhor visualizado por um aumento no período entre partos, além de maior intervalo de picos de lactação consecutivos. Os prejuízos podem ser medidos por cada dia em aberto que o animal permanece no sistema após os 60 dias pós-parto. Em sistema de produção a pasto, as fêmeas não gestantes permanecem consumindo e, muitas vezes os prejuízos passam despercebidos (WHITLOCK et al., 2008).

Falhas na ovulação ou fertilização, morte embrionária precoce, perdas fetais e abortos estão entre as principais causas de redução na fertilidade de fêmeas bovinas. As etiologias relacionadas as perdas gestacionais podem ser atribuídas aos agentes infecciosos ou causas não infecciosas (fatores nutricionais, ambientais, manejo, etc). Dentre os inúmeros agentes infecciosos responsáveis por falhas reprodutivas em bovinos, três patógenos se destacam pela extensa distribuição e pela dificuldade no controle por parte das agências de sanidade animal: *Neospora caninum*, Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1, relacionado a síndrome da rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR) e o vírus da diarréia bovina (BVDv). Estes patógenos causam infertilidade temporária, retorno ao cio, mortalidade embrionária ou fetal, nascimento de bezerros fracos, rinotraqueíte, abortos no terço final da gestação entre outras. O modelo adotado pelas principais propriedades leiteiras, favorecendo a disseminação de agentes infecciosos dentro dos rebanhos sendo raras as propriedades onde não existe soroprevalência por alguns destes agentes. Pelo valor individual de cada gestação e facilidade de disseminação dos patógenos, além de programas eficientes de imunização, o

monitoramento da prevalência dos agentes é muito importante para que as estratégias de controle sejam devidamente concebidas, implantadas e monitoradas.

O presente trabalho tem como objetivo, propor um sistema de monitoramento da prevalência das principais doenças reprodutivas, como a BVD, Neospora e IBR em rebanhos leiteiros, através dos exames sorológicos implementados na rotina das fazendas.

Material e Métodos

Rebanhos e Animais

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) parecer Nº17 A/2017. Sendo realizado em 3 rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas gerais, com média de produção superior a 20 Kg de leite/dia. No total foram examinados 216 animais, como critério de inclusão das propriedades, foi a utilização de raças especializadas (1ª Holandês, 2ª Jersey e 3ª Girolando), cada propriedade possui apenas uma das raças, além do manejo dos animais em confinamento, com suplementação volumosa e concentrada durante todo o ano. Nenhuma das propriedades tinha histórico de vacinação pelo menos nos últimos 12 meses antes da coleta das amostras. Todas as propriedades fazem uso da biotécnica de inseminação artificial e as propriedades do gado Holandês e a do gado Jersey, já utilizaram touro de repasse. As informações do rebanho, como categoria (vaca, novilha e bezerra) e ordem de parto dos animais adultos foram recuperadas em cada uma das propriedades.

Coleta e preparo das amostras

Em cada rebanho, todos os animais acima de 3 meses foram incluídos no estudo. Amostras sanguíneas foram coletadas por punção da veia ou artéria coccídea com uma agulha vacutainer 25x8 mm, utilizando tubos vacuolizados e heparinizados, armazenadas em embalagens isotérmicas contendo gelo e mantidas até a chegada ao laboratório de diagnóstico. No laboratório, as amostras passaram pela centrifuga a 600G por 10 min e o plasma recuperado por pipeta automática foi armazenado em tubos eppendorff e estocado a -20°C para posterior

realização do teste de ELISA, com a finalidade de pesquisar anticorpos contra os vírus causadores da IBR e da BVD, bem como do protozoário Neospora.

Testes de ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay)

Todas as amostras foram submetidas ao exame de ELISA para pesquisa de anticorpos contra os vírus da IBR e da BVD, além do protozoário causador da Neosporose. Para os animais suspeitos de serem persistentemente infectados (PI) para BVD, foi realizada pesquisa adicional de antígenos para o agente. Os testes de ELISA foram realizados com os seguintes Kits: IDEXX IBR gB X2, IDEXX BVDV Total Ab, IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, IDEXX Neospora X2, respeitando o protocolo recomendado pelo fabricante para cada Kit, IDEXX Brasil Laboratórios Ltda, São Paulo, SP.

Os resultados das leituras das placas de ELISA foram expressos pela relação da leitura de densidade óptica da amostra pela leitura do controle positivo (S/P), sendo esta variável utilizada nos exames de pesquisa do BVD (Ag e Ac) e Neospora. De outra forma, o percentual de bloqueio da densidade óptica (BO) foi utilizado para expressar os resultados do teste para anticorpos contra o vírus causador da IBR. Os métodos de cálculo destas variáveis (S/P e BO) estão expressos abaixo:

$$S/P = (DO_A - DO_{CN}) / (DO_{CP} - DO_{CN});$$

$$BO = 100 \times (DO_{CN} - DO_A) / DO_{CN};$$

Sendo:

DO_A – densidade óptica da amostra;

DO_{CP} – densidade óptica do controle positivo;

DO_{CN} – densidade óptica do controle negativo.

Depois de realizados os valores de densidade óptica lidos nos controles negativos e positivos foram utilizados para proceder os cálculos de validação dos testes, segundo os critérios recomendados pelo fabricante (IDEXX Brasil Laboratórios Ltda, São Paulo, SP).

Análises Estatísticas

As variáveis quantitativas (S/P) das leituras dos exames foram testadas para a distribuição normal utilizando a estatística de Shapiro Wilk. Variáveis que não apresentaram comportamento normal foram transformadas em logaritmos naturais (Neospora) ou raiz quadrada (BVD). Variáveis qualitativas (BO e Percentual de positivos) foram testadas pela estatística de Kruskal Wallis. Em todos os casos o modelo experimental incluiu o efeito de propriedade, categoria animal, idade e ordem de parto. O modelo foi testado pelo procedimento estatístico PROC GLM (SAS Institute Inc. 2011) e as médias dos efeitos significativos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Resultado e Discussão

Prevalência de Animais Soropositivos dentro de cada Propriedade

A prevalência dos agentes infecciosos nas propriedades foi mensurada através da sorologia que pesquisa imunoglobulinas específicas contra os vírus BVD, IBR e o protozoário *Neosporum Caninum*. As sorologias que atingiram o limiar entre $\geq 0,20$ e $< 0,30$ foram considerados suspeitos ou $\geq 0,30$ foram positivos para BVD, para o protozoário *Neospora Caninum* $\geq 0,30$ e $< 0,40$ foram considerados suspeitos ou $\geq 0,40$ foram positivos, em relação a absorvância pela amostra (S/P) e para IBR $\geq 0,45$ e $< 0,55$ foram considerados suspeitos ou $\geq 0,55$ foram positivos, em relação ao bloqueio da amostra (BO). Todos esses valores são determinados pelo fabricante do kit utilizado, foram consideradas positivas e o percentual está representado tabela 1.

De posse dos dados obtidos após a implementação dos exames sorológicos na rotina das fazendas, chegamos aos seguintes resultados expressos no gráfico a seguir, que representam a ação das doenças nos rebanhos monitorados, figura 1.

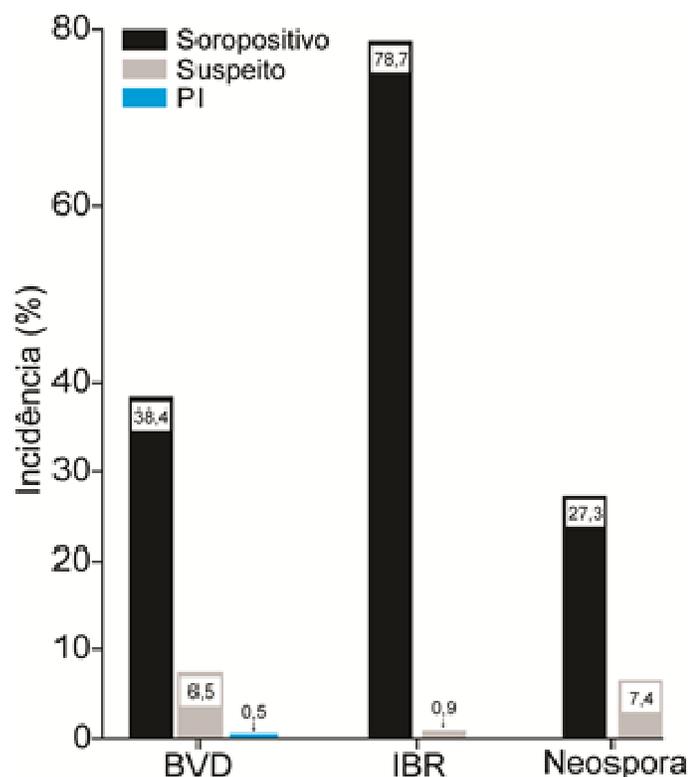


Figura 1: Prevalência de animais reagentes positivamente soro sanguíneo individual, submetidos ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da BVD, IBR e protozoário *Neospora Caninum* em 3 propriedades no Sul de Minas Gerais de Setembro de 2014 a Março de 2015.

Tabela 1: Resultado da pesquisa dos agentes infecciosos BVD, IBR e *Neospora* por propriedade.

Propriedade	n	% de animais soropositivos		
		BVD	IBR	Neospora
1 Holandês	40	58,0 ^{Aa}	85,0 ^a	35,0 ^a
2 Jersey	145	44,8 ^{Ba}	85,5 ^a	40,0 ^a
3 Girolando	31	9,7 ^b	51,6 ^b	11,4 ^b

^{a,b,c} Indicam diferenças estatísticas ($P < 0,001$) na mesma coluna;

^{A,B} Indicam aproximação da diferenças estatísticas ($P < 0,1$) na mesma coluna. Teste de Qui-quadrado.

Neospora Caninum

Pesquisas têm sido desenvolvidas no Brasil no sentido de relacionar outros fatores de risco para a infecção desses agentes nos bovinos, como a desenvolvida por Guimarães et al. (2004), associando variáveis como raça, histórico reprodutivo completo, alimentação, além da idade e da presença de cães nas propriedades com a soropositividade a anticorpos contra o protozoário *Neospora*.

Hietala e Thurmond (1999) relataram que os níveis de anticorpos podem apresentar oscilações com a idade, animais entre 13 e 24 meses apresentam baixa soroprevalência em relação a outras faixas etárias, e sugeriram que isto ocorre devido ao declínio de anticorpos em bovinos congenitamente infectados. Em trabalho realizado por (REGIÃO et al., 2006) comparando as faixas etárias dos bovinos com relação à presença de anticorpos, observou-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as faixas de 0 a 24 meses e de 24 a 48 meses, apontando maior prevalência de bovinos soropositivos com idade entre 24 e 48 meses. Hemphill e Gottstein (2000) na Inglaterra não observaram evidência no aumento da soroprevalência de acordo com a idade dos bovinos estudados. Resultado semelhante foi observado por Pitel et al. (2001) na França.

No Brasil, Melo et al. (2001), estudando fêmeas leiteiras do Estado de Minas Gerais, também não observaram diferenças entre as faixas etárias de sete a 18 meses, 19 e 30 meses e fêmeas acima de 31 meses, sugerindo haver mesma exposição dos animais ao parasito. No presente trabalho, quando comparadas às faixas etárias, notamos que não houve diferença estatística ($P < 0,6$). Estes dados corroboram com os obtidos por (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2000); (PITEL et al., 2001) e (MELO et al., 2001). O descarte e a reposição de animais do rebanho também podem interferir nos resultados (ANDERSON et al., 2000).

Na propriedade com rebanho holandês, com um dos maiores percentuais 35% de animais soropositivos, havia histórico de vacinação contra *Neospora*, porém as vacinações foram realizadas entre os anos de 2008 a 2014 e compra animais para reposição. Já na propriedade com rebanho Jersey, identificamos uma grande atividade de compra e venda de animais, o que explica a concentração de animais positivos, uma vez, que uma parte considerável foi positiva 40%. E por fim, a propriedade com rebanho Girolando que possui 11,4% de animais positivos, tem pouco fluxo de animais de leilão e a maioria do rebanho é crioulo da fazenda. Na

tabela 2, podemos analisar a média individual de cada propriedade em relação à nota de corte do teste.

Tabela 2: Média da sorologia do protozoário *Neospora Caninum*, em relação da amostra pela absorvância.

Propriedade	n	Neospora-Ac
1 Holandês	40	0,641±0,80 ^a
2 Jersey	145	0,315±0,32 ^b
3 Girolando	31	0,164±0,18 ^c
Valor de P		< 0,0014

Kruskal wallis, Tukey

A atividade sorológica dos animais para *Neospora* diferiu somente entre as propriedades ($P < 0,02$) e não de acordo com as categorias animais ($P < 0,6$). Na média geral 27,3% das sorologias foram positivas, segundo metodologia do fabricante do kit, não diferindo entre categorias ou ordem de parto.

Resultado encontrado por (CORBELLINI et al., 2000) através da imunistoquímica, confirma 10% (3/30) dos animais positivos para *Neospora* na região do Rio Grande do Sul, ficando bem abaixo do obtido nesse trabalho. Melo e Leite (1999) determinaram pelo teste de Elisa a ocorrência de 7,7% dos animais em Minas Gerais, contudo em publicação de (MELO, 2001) esse número já havia sido alterado, atingindo 18,7% dos animais. Ragozo et al., (2003), revelou resultado muito parecido com o do presente trabalho, 29% de animais infectados, destacando o avanço da doença. Dados interessantes foram obtidos em estados que circundam Minas Gerais. Trabalho executado por (COSTA et al., 2001) no estado de São Paulo, utilizando a técnica da Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), constatou 6,8% de soropositivos. Assim podemos destacar os dados levantados por (ANDREOTTI et al., 2002), em São Paulo 41,6% e Goiás 17,4% e (Munhoz et al., 2002b), 33,6% (Munhoz, 2002a), 23,8%.

Segundo Guedes et al., (2008) em pesquisa na microrregião de Lavras, identificou para os animais das fazendas, frequência média global de 91,2%

(510/559), em animais de matadouro 97,2% (559/575), nos fetos 12,7% (64/503) e confirmação do protozoário presente em 100% dos rebanhos. Esses valores estão muito acima dos descritos por todos os autores citados até o momento, inclusive os valores do presente trabalho. O fato das propriedades possuírem o sistema de criações semelhantes, sem dúvida, facilita a ingestão de oocistos favorecendo a transmissão horizontal dentro do rebanho. Embora esta via seja reconhecida como uma rota secundária de infecção (DAVISON et al., 1999), como verificado por (GUEDES et al., 2008; CORBELLINI et al., 2006) em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. A maior frequência dos bovinos infectados por *Neospora* foi observada nos animais mais velhos, indicando a idade como fator de risco (SANDERSON et al., 2000; GUIMARÃES JUNIOR. et al., 2004). Estudos desenvolvidos em rebanhos Costa Rica (ROMERO et al., 2002) e na Alemanha (DIJKSTRA et al., 2003), relatam que a taxa de infecção congênita diminui com o aumento do número de gestações e idade das vacas, assim como a imunidade adquirida atenua a possibilidade de recrudescência da infecção, reduzindo a taxa de transmissão vertical do *Neospora Caninum*.

Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV- 1)

A prevalência das infecções por BoHV-1 e BoHV-5, em rebanhos leiteiros no sul do Estado de Minas Gerais, de um total de 216 animais, 78,7% (170/216) das amostras foram positivas de acordo com a metodologia do fabricante dos kits, na figura 1. A atividade sorológica da IBR não diferiu ($P < 0,4$) entre as propriedades, sendo observado apenas efeito significativo ($P < 0,0001$) de categoria.

As vacinas inativadas são capazes de minimizar a manifestação dos sinais clínicos e reduzir a excreção viral, entretanto não foram efetivas na prevenção da primo-infecção em bezerros amamentados com o colostro de vacas imunizadas durante a gestação (MOREIRA et al., 2001). Bovinos de todas as idades e raças são susceptíveis à infecção pelo BoHV-1, no entanto, ocorre mais comumente em animais acima de seis meses de idade e isto deve-se, provavelmente, à presença de anticorpos maternos em animais mais novos, podendo atenuar a gravidade da infecção (DONKERSGOED e BABIUK, 1991).

Segundo Silva et al. (2007), há necessidade de reavaliação dos critérios para o licenciamento e a importação de vacinas contra BoHV-1, já que as seis

vacinas comerciais testadas no estudo falharam ao induzir uma resposta imunológica adequada. Contudo, a eficiência de produtos biológicos geralmente é questionada, quando são mal prescritos ou mal administrados. Estudo feito por (FINO et al., 2012) evidenciou que as vacas continuaram abortando mesmo depois de terem sido vacinadas contra BVDV e BoHV-1, quando esses rebanhos apresentavam altos títulos para *N. caninum*.

CHAVES et al., (2010), em relação à faixa etária, encontraram maior prevalência de animais reagentes de 3 a 7 anos, com 45,76% (n=362) de positividade e significância estatística ($P < 0.005$). Animais na idade adulta são mais comumente afetados pelo vírus, pois reflete a idade em que ocorre maior estresse em função da movimentação dos animais, maior grau de exposição ao vírus, provavelmente pela introdução de bovinos soropositivos nos lotes de produção, onde o animal portador está excretando o vírus em suas secreções. Os animais em idade adulta estão no ápice das suas atividades produtivas e reprodutivas, sendo exigidos ao máximo. As faixas etárias menores que três anos e maiores que sete anos evidenciaram frequências de 9,57% e 5,54%, respectivamente.

O trabalho verificou níveis mais altos de anticorpos foram encontrados nos animais adultos ($90,0 \pm 6,8\%$), quando comparados aqueles em desenvolvimento ($39,6 \pm 27,1\%$). Apesar do percentual médio de bloqueio não ter diferido entre as categorias, sendo grande concentração nos animais de primeiro e segundo parto (46,5% e 24,7%).

Tabela 3: Porcentagem de bloqueio das amostras em relação ao vírus da IBR.

<i>Categoria</i>	<i>n</i>	<i>IBR-Ac</i>
<i>Adultos</i>	111	90,0±6,8
<i>Jovens</i>	34	39,6±27,1
<i>Valor de P</i>		< 0,0001

Kruskal wallis, Tukey

Por tratar-se de um herpes vírus, onde, uma vez infectado o animal permanece com o agente pelo resto da vida, característica essa, que dificulta a

validação de exames sorológicos para pesquisa do vírus. Da mesma forma, a vacina contra IBR induz uma imunidade mais duradoura do que as vacinas atualmente comercializadas para BVD. No entanto, estes resultados não refletem a real atividade viral nas localidades, podendo ser apenas um reflexo do intervalo maior ou menor entre a última vacinação e a amostragem, bem como a diferença entre episódios de viremia recentes ou há mais tempo.

Para IBR encontramos diferentes índices de ($P < 0,001$) prevalência de sorologias positivas, com valores variando de 85,0% a 51,6%, semelhante aos estudos feitos em várias regiões do país, que vêm demonstrando altas taxas de rebanhos soropositivos (GALVÃO et al., 1963; WIZIGMANN et al., 1972; MUELLER et al., 1981; RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995). Pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul apontam variações de prevalência da doença de 18,8% a 81,75% (WIZIGMANN et al., 1972; RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995; POLETTO et al., 2004), assim como a população estudada, bovino de corte (VIDOR et al., 1995) ou leite (LOVATO et al., 1995) podem influenciar. Bezerra (2012) no Maranhão relatou uma prevalência de 69,25% ($n = 277$) dos animais analisados, com frequência de 100% de rebanhos soropositivos para o BoHV-1. Frequência essa também identificada em nosso estudo, uma vez que não basta somente cuidar dos bovinos, pois sabemos que os vírus BoHV-1 e BoHV-5 tem capacidade de infectar outras espécies, como cabras, ovelhas, cervos, entre outros. Tornando-se reservatório alternativo para esses vírus (SIX et al., 2001; KEUSER et al., 2004; THIRY et al., 2006; MUYLKENS et al., 2007). No Uruguai um levantamento soropidemiológico feito por Guarino et al. (2008), revelou uma prevalência de 37% e determinou que 99% dos rebanhos possuíam ao menos um animal soropositivo, fato que preocupa pela facilidade de comercializar animais na região de fronteira. Holz et al. (2009), examinou 2200 soros provenientes de 390 propriedades do Rio Grande do Sul e identificou uma prevalência de 29,2% (642/2200) de soropositivos em 57,7% das propriedades (225/390), com prevalência de 59,2% em animais vacinados e não-vacinados. Em (2001) Alfieri apontou a seguinte situação: Paraná 54,3%, rio Grande do Sul 44,4%, Minas Gerais 84,9%, São Paulo 74,9%, Rio de Janeiro 70,8%, Rondônia 91,2%, Mato Grosso do Sul 75,8%, Mato Grosso 75,7%, Santa Catarina 42,3% e Goiás 73,8% de prevalência do BoHV-1. Todos os dados compilados acima, demonstram que mesmo com o avanço tecnológico da pecuária nos últimos anos e a maior

divulgação das pesquisas, a infecção por HVB-1 ainda apresenta caráter endêmico, atingindo tanto animais de leite quanto de corte, inviabilizando a curto prazo uma política nacional de erradicação.

Diarreia Viral Bovina (BVD)

Para BVD, novamente o efeito de propriedade foi significativo ($P < 0,0001$), com variação da atividade viral desde valores altos como 58% (23/40) e 44,8% (67/145), até valores baixos de 9,7% (3/31) e também de categoria animal ($P < 0,001$). Com sorologias mais baixas nos animais jovens e mais altas nos animais em lactação, a imunidade vacinal e colostrar também foi mais baixa. Do total de amostras, encontramos 38,4% de sorologias positivas. Sendo grande concentração nos animais de primeiro e segundo parto (43,4 e 32,5%). As propriedades investigadas em Minas Gerais possuem um sistema de criação intensivo ou semi-intensivo, que segundo Houe (1999), o sistema de criação intensivo favorece maior disseminação do vírus.

A prevalência de sorologias positivas também foi influenciada ($P < 0,05$) pela ordem de parto e categoria animais, com maior concentração na população de vacas lactantes e secas, com maior ordem de parto. Na tabela 4, verificamos a variação entre propriedades.

Tabela 4: Índice de absorbância em relação à amostra para o vírus da BVD.

<i>Propriedade</i>	<i>N</i>	<i>BVD-Ac</i>
<i>1 Holandês</i>	40	0,636±0,5 ^a
<i>2 Jersey</i>	145	0,295±0,3 ^b
<i>3 Girolando</i>	31	0,092±0,3 ^c
<i>Valor de P</i>		< 0,0001

Kruskal wallis, Tukey

Resultados semelhantes foram relatados (CASTRO, 1988), detectou-se 37,3% de animais positivos para BVD em Minas Gerais, pesquisando fêmeas bovinas em programas de transferência de embriões. Langoni et al. (1999) identificaram 33,3% de amostras positivas para BVD em soros oriundos de diferentes regiões do interior de Estado de São Paulo.

De acordo com Houe (2001), investigações epidemiológicas realizadas em diversas regiões dos Estados Unidos e Europa revelam uma incidência que varia de 60 a 80% de animais soropositivos para Diarréia Viral Bovina. Ribeiro et al. (2009) estudando animais de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo verificou que de 66,07% a 68,67% animais foram reagentes ao BVD. Estes dados são compatíveis com outros trabalhos nacionais sobre a ocorrência de anticorpos em bovinos (PELLEGRIN et al., 1997; BOTTON et al., 1998; PITUCO; DEL FAVA, 1998; DIAS; SAMARA, 2003; NORONHA et al., 2003), e que 71,87% (373/519) das amostras MG eram sororeagentes.

Resultado semelhante ao de Dias (2008), que encontrou 60% de reagentes no mesmo estado e em sistema de criação semelhante. Em trabalho executado por Caron et al. (2001), a taxa de prevalência para BVD foi de 67,5% que foi considerada alta, já que tratam-se de animais oriundos de grandes bacias leiteiras do Paraná, sendo a maioria fazendas leiteiras produtoras de leite B e com bom manejo sanitário e nutricional. Dias et al.,(2003) pesquisando amostras de soro proveniente de animais do Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo, concluiu que 57,18% dos animais apresentavam anticorpos contra o vírus da BVD.

Enquanto que nas amostras de leite individual, a quantidade de amostras reagentes foi menor do que as do soro sanguíneo, comprovando as afirmativas feitas por (KLINTEVALL et al., 1991; KRAMPS et al., 1999; SCHRIJVER e KRAMPS, 1998), que a quantidade imunoglobulinas no leite é bem menor do que no soro sanguíneo. Além do fato, de que a determinação da presença de anticorpos contra o vírus da BVD, no soro sanguíneo é mais sensível e específica do que no leite. Dados do Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico (LVB- IB), obtidos no período de janeiro de 1999 a abril de 2005, em rebanhos leiteiros e de corte de diferentes estados brasileiros, revelaram 50,13% (8.167/16.291) de animais soro reagentes, por meio da virusneutralização com a estirpe NADL (PITUCO, 2006).

Apesar de hoje conhecermos bem mais sobre essa doença, a importância da enfermidade é restrita aos produtores mais tecnificados ou aqueles que integram um programa de extensão. Uma vez que no Brasil, não existe um programa oficial de controle e erradicação (FLORES et al., 2005). O monitoramento das propriedades deve ser realizado periodicamente, utilizando-se de testes laboratoriais que permitam demonstrar a contínua ausência da circulação viral ou detectar precocemente a sua entrada, caso as medidas preventivas não sejam completamente eficazes (PACHECO, 2010).

Durante a investigação das amostras para identificação de possíveis indivíduos persistentemente infectados (PI), as médias dos animais da propriedade número 1, eram bem acima da média global dos demais. Nessa propriedade foi encontrado um animal suspeito, figura 2, comprovando assim, o fato da propriedade possuir a maior média sorológica e incidência da doença, ajudaram bastante no diagnóstico do animal acometido. Posteriormente confirmado como permanentemente infectado (PI), figura 3.

Condição em que o sistema imunológico identifica o vírus como partícula do próprio organismo, servindo de fonte de transmissão para o rebanho. Podemos observar o animal PI e um animal sem o vírus na figura 1. São fontes primárias de disseminação do vírus nos rebanhos (GROOMS, 2004), tornando-se os principais alvos nos programas de controle e erradicação (HOUE et al., 2005; VAN CAMPEN, 2010). A geração ocorre entre 40 e 120 dias de gestação, através da contaminação pela cepa não citopática (RIDPATH e FLORES, 2007).



Figura 2: Animal permanentemente infectado (PI) à esquerda e animal do grupo contemporâneo livre do vírus da BVD à direita.

O presente trabalho revelou a presença de 0,5% (1/216) de prevalência de animais PI na região do sul de Minas Gerais, valor bem abaixo daquele encontrado por Santos et al., (2011), 2,89% (5/173) em bezerros no município de Viamão, Rio Grande do Sul. Este resultado corrobora com o detectado por (DIAS, 2008), onde a prevalência foi de 2,63%(2/76) em Poço Fundo, Minas Gerais. Contudo, esse valor de PI esta inserido no proposto por (HOUE, 1995), entre 0,5% e 2%, que pode ser até duas vezes maior quando estes são detectados nos animais jovens. Os animais PI tinham entre 4 e 5 meses de idade, eram bezerros saudáveis e não apresentavam diferenças dos demais bovinos da mesma faixa etária (HOUE, 1993). Três meses mais tarde um deles apresentou sinais clínicos da doença e veio a óbito, podendo os sinais oriundos de outras etiologias ou queda do sistema imune, comum nos PI (BOLIN, 1990).



Figura 3: Animal suspeito de ser PI, coleta de material auricular para confirmação no teste de antígeno.

Conclusões

Os resultados encontrados neste levantamento confirmam a necessidade de monitorar a atividade desses agentes infecciosos na rotina das fazendas. Para elaboração de um programa eficiente de controle, através do diagnóstico sorológico e vacinações regulares.

Para BVD e IBR o fator de categoria teve efeito significativo, atingindo animais adultos e concentrando-se naqueles mais velhos de primeira e segunda cria ou aqueles com mais tempo no rebanho.

O manejo das propriedades também é um fator de risco importante para disseminação e prevalência das doenças no rebanho. Para tanto, incluem alta concentração destes animais em pequenas áreas, fluxo de animais entrando no rebanho sem exames, viagens para feiras e exposições e todas as situações que possam desencadear o estresse.

Os dados fornecidos pelas titulações possibilitam enxergar os rebanhos de forma mais crítica e nos permitindo de acordo com a média obtida, saber se os agentes estão sobre controle ou se precisamos intervir com vacinações.

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A.A. **Rinotraqueite Infecçiosa Bovina (IBR)**: epidemiologia, imunologia imunoprofilaxia. Disponível: <www.pfizer.com.br> Acesso em: 12 maio 2001.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-431, jul. 2000.

ANDREOTTI, R., PINCKNEY, R., GOMES, A., PIRES, P. P., SILVA, E. A. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro, **Anais...**Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. 1 CD-ROM.

BENETTI, A, H. **Pesquisa de anticorpos anti-Neospora caninum em bovinos leiteiros da região sudoeste do estado de Mato Grosso**. 2006. xiv, 54 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.

BEZERRA, D.C; CHAVES, N.P.; SOUSA, V.E.; SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M Prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros no estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.19, p.158-162, dez. 2012.

BOLIN, S. R. The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. **Veterinary Medicine**, v. 85, p. 1124-1132, may 1990.

BOTTON S.A.; SILVA A.M.; BRUM M.C.S.; WEIBLEN R. ; FLORES E.F. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.31, p.1429-1438. 1998.

CARON, L. F. **Intercorrência entre diarreia viral bovina (bvdv), rinotraqueite infecciosa bovina (ibr/ipv) e leptospirose dos bovinos em vacas leiteiras**

descartadas. 2001. 47 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CASTRO, R.S. **Desempenho reprodutivo, até 60 dias de gestação em doadoras de embriões bovinos, frente a infecções por diarreia a vírus, herpes virus bovino tipo 1, leucose e língua azul, em Minas Gerais.** 1988. 93 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CHAVES, N.P.; BEZERRA, D.C.; SOUSA, V.E.; SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense, Brasil. **Ciência Rural.** v.40, p.1448-1451, 2010.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; DIAS, M.M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural,** v. 30, p. 863-868, 2000.

CORBELLINI, L.G.; SMITH, D.R.; PESCADOR, C.A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D.J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine,** v. 74, p. 130-141, 2006.

COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. L. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina,** v.22, p.57-62, 2001.

DAVISON, H.C.; OTTER, O.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *N. caninum* in dairy cattle. **International Journal for Parasitology,** v. 29, n. 10, p. 1683-1689, oct. 1999.

DIAS, F. C. **Vírus da diarreia viral bovina (BVDV): caracterização epidemiológica e molecular nos estados de Minas Gerais e São Paulo, Brasil.** 2008. 157 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 161-168, 2003.

DIJKSTRA, TH.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M.L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 161- 169, 2003.

DONKERSGOED, J.V.; BABIUK, L.A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, p. 86-94, 1991.

FINO, T. C. M., MELO, C. B., RAMOS, A. F., & LEITE, R. C. (2012). Infecções por herpesvirus tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.122–127, 2012.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p.125-134, 2005

GALVÃO, C.L.; DORIA, J.D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Bol Inst Biol Bahia**, v.6, p.15-25, 1962/1963.

GROOMS D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Vet. Clin. Food Anim. Pract.** , v.20, p.5-19, 2004.

GUARINO, H.; NUÑEZ, A.; REPISO, M.V.; GIL, A. ; DARGATZ, D.A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, p.34-40, 2008.

GUEDES, M.H; GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.; HIRSCH, C. Frequency of anti-Neospora caninum antibodies in cows and fetuses from Municipalities of southern Minas Gerais. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.17, p.189–194, 2008.

GUIMARÃES JUNIOR., J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of Neospora caninum antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.A. European perspective on Neospora caninum. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1887-1924, 2000.

HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Post natal Neospora caninum transmission and transient serologic responses in two dairies. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1669-1676, 1999 .

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, H. B. C. R.; CAMPOS, F. S.; SILVA, R. J.; VARELA, A. P. M.; CENCI, A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p.767-773, 2009.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America*. **Food Animal Practice**, Philadelphia, 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; Epidemiology and economical importance of BVDV infections. Disponível: www.vu-wien.ac.at/i123/Epidemio/HOUE.html. Acesso em 09 fev.2001.

HOUE H.; LINDEBERG A.; MOENNING V. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Anim. Health. Res. Rev.** , v.6, p.63-74, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.com.br>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

KEUSER, V.; SCHYNTS, F.; DETRY, B.; COLLARD, A.; ROBERT, B.; VANDERPLASSCHEN, A.; PASTORET ,P.P. ; THIRY, E. Improved Antigenic Methods for Differential Diagnosis of Bovine, Caprine, and Cervine Alphaherpesviruses Related to Bovine Herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.1228–1235, 2004.

KLINTEVALL, K.; NÄSLUND, K.; SVEDLUND, G.; HAJDU, L.; LINDE, N.; KLINGEBORN, B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 319- 333, 1991.

KRAMPS, J. A.; MAANEN, C. V.; WETERING, G. V.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RØNSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology, Netherlands**, v. 64, p. 135-144, 1999.

LANGONI, H. et al. Inquérito sorológico para a rinotraqueíte infecciosa bovina (RIB) e diarreia a vírus dos bovinos (DVB). **Veterinária Notícias**, v.5, p. 121-124, 1999.

LOVATO L.T.; WEIBLEN R.; TOBIAS F.L.; MORAES M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 25, p.425-430, 1995.

MELO, C. B., LEITE, R. C. Neospora caninum em Minas Gerais: dados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador, **Anais**. Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p.225-226.

MELO, C. B. **Neospora caninum em Minas Gerais** : aspectos epidemiológicos. 2001. 131 p. Tese (doutorado) –Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOREIRA, S.P.G; SÂMARA, S.I.; ARITA, G.M.M; FERREIRA, F.; PEREIRA, G.T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.38, p.127-130, 2001.

MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; MACHADO, T. S. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, p. 55-59, 1981.

MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; ALMEIDA, C. R. R.; LOPES, C. W. G. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em vacas no rebanho leiteiro do município de Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002a, 1 CD ROM.

MUNHOZ, A. D.; SILVA, R. T.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA, M.; ALBUQUERQUE, G. R.; LOPES, C. W. G. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em vacas no rebanho leiteiro do município de Resende, Estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002b. 1 CD ROM.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research** v.38, p.181-209, 2007.

NORONHA, R. P.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Pesquisa do vírus da diarréia viral bovina em bovinos jovens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 424-430, 2003.

PACHECO J.M.C. **Caracterização do perfil de risco e avaliação de práticas de biossegurança em explorações produtoras de leite.** 2010. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade do Porto, 2010. (Disponível em: http://sigarra.up.pt/icbas/teses_posgrad.tese?P_SIGLA=MIMV&P_ALU_NUMERO=021003047&P_LANG=00>).

PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; LEITE, R. C. Seropositivity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in Zebu cows in the Brazilian Pantanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, p. 375-377, 1997.

PITEL, P.H.; PRONOST, S.; CHATAGNON, G.; TAINTURIER, D.; FORTIER, G.; BALLEST, J.J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of Neospora caninum DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of Neospora caninum in cattle and dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 102, p. 269-277, 2001.

PITUCO, E. M. **Relatórios disponíveis no Laboratório de Vírus de Bovídeos** : Instituto Biológico . São Paulo, 2006.

PITUCO, E.M.; DEL FAVA, C. Situação do HVB-1 na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL HERPES VÍRUS BOVINO E DIARRÉIA VIRAL BOVINA. 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 1998. p.49-57.

POLETTI, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C. ;BARCELLOS L.J.G. Prevalência de tuberculose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, p.595-598. ,2004.

RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p. 33-37, 2003.

RAVAZZOLO A.P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v 17, p. 98-95, 1989.

RIDPATH J.F.; FLORES E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.), **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. p.563-592.

RIBEIRO, C. P. **Avaliação da virusneutralização cruzada frente BVDV-1 e BVDV-2 no diagnóstico da diarreia viral bovina em animais naturalmente infectados**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo –São Paulo.

ROMERO, J.J.; PEREZ, E.; DOLZ, G.; FRANKENA, K. Factors associated with Neospora caninum serostatus in cattle of 20 specialized Costa Rican dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, p. 263-273, 2002.

SANDERSON, M.W.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V. N.caninum seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 15-24, 2000.

SANTOS A.S., ANTONIASS, N.A.B., BOABAID F.M., BITENCOURT A.P.G., ALMEIDA L.L., CANAL C.W., FLORES E.F. & DRIEMEIER D. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. 2011, vol.31, n.10, pp.885-892. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001000009>. Acesso em: 29 Out 2015.

SILVA, M.S. et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, p. 191-199, 2007.

SIX, A.; BANKS, M.; ENGELS, M.; ROS BASCUÑANA, C.; ACKERMANN, M. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Archives of Virology**, v.146, n 7, p.1325-1335, 2001.

SCHRIJVER, R. S.; KRAMPS, J. A. Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent formats. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 17p. 550-561, 1998.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A. ; THIRY, E. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine Herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, p.169-190, 2006.

VAN CAMPEN ,H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. **Vet. Microbiol.** v.142, p.94-98, 2010.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE ,T.E. ; COSWIG, L.T. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural** , v.25 , p.420- 424, 1995.

WHITLOCK, B.K., MAXWELL, H.S. Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle. **Theriogenology** , v.70, p.550–559, 2008.

WIZIGMANN, G.; VIDOR ,T. ; RICCI, Z.M.T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarréia a vírus - Enfermidade das Mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 1, p.52-58, 1972.