UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária

Dissertação

Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS

Róber Zardo

Pelotas, 2017

Róber Zardo

Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Odir Antônio Dellagostin

Coorientador: Dr. Fabio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

Z36p Zardo, Róber

Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, Leptospira spp. e Neospora caninum em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS / Róber Zardo ; Odir Antônio Dellagostin, orientador ; Fábio Pereira Leivas Leite, coorientador. — Pelotas, 2017.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Doenças reprodutivas. 2. Soroepidemiologia. 3. Vacinas. 4. Fatores de risco. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. Leite, Fábio Pereira Leivas, coorient. III. Título.

CDD : 636.213

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Róber Zardo

Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador)
Doutor em Biologia Molecular pela University of Surrey

Prof. Drª. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Sérgio Jorge
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico àquele que tornou tudo isso possível, Deus.

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo, a Deus. Ele que toma conta da minha vida, que me faz sentir seguro mesmo pisando no escuro, que foi na frente abrindo os caminhos, iluminou cada momento, fez com que tudo se encaixasse de maneira absolutamente perfeita. Agradeço por cada oportunidade de aprender, por cada pessoa que pôs em meu caminho.

À minha mulher Jenifer e a toda minha família pela compreensão durante os momentos de ausência, pelo carinho, paciência e por estarem ao meu lado me apoiando e incentivando em todos os momentos.

À Tatiane Senna Bialves, pela perseverança e extrema dedicação ao projeto, pela confiança depositada, e principalmente pela amizade verdadeira que construímos. Sem você certamente não haveria resultado algum.

Aos professores Odir Antônio Dellagostin e Fábio Pereira Leivas Leite, pela oportunidade e por todo os ensinamentos acadêmicos e de vida compartilhados neste período de convivência. Vocês são um exemplo pra mim e tenho muito orgulho por ter sido orientado por vocês.

Ao colega Neuro Luiz Tonin, pelo incentivo em iniciar esse novo projeto, sem o seu direcionamento certamente nada disso teria acontecido.

À equipe do Laboratório de Vacinologia da UFPel, por terem me acolhido e por todo o auxílio na prática de laboratório, em especial ao Matheus Costa da Rosa, um grande amigo que foi quase um terceiro orientador, acompanhou nosso trabalho desde o início e nos amparou em todos os momentos.

Aos colegas da Secretaria Municipal de Agricultura de Novo Xingu, por toda ajuda no mapeamento das propriedades e coleta das amostras, em especial ao secretário Reinaldo Schorn, pela compreensão e ajustes de horário que tornaram tudo isso possível.

Enfim, a todos que fizeram parte deste projeto ou que contribuíram de alguma forma para que o objetivo fosse alcançado, muito obrigado.

"Só somos verdadeiramente donos do nosso destino quando formos capazes de entregá-lo nas mãos de Deus."

Resumo

ZARDO, Róber. **Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS.**2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

As doenças reprodutivas infecciosas geram grandes prejuízos à exploração pecuária devido à ocorrência de abortos, perdas embrionárias e queda na produção. Assim, estabelecer uma estimativa da distribuição destas doenças no rebanho é fundamental na adoção de medidas de prevenção e controle. Este estudo teve o objetivo de investigar a soroprevalência de anticorpos contra BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* no rebanho leiteiro do município de Novo Xingu através de soroneutralização, teste de aglutinação microscópica, imunofluorescência e ELISA, respectivamente. Para isso, foram coletadas 405 amostras de soro de fêmeas bovinas leiteiras provenientes de 109 rebanhos e determinadas as variáveis associadas à infecção por cada agente. As amostras foram divididas em duas categorias de acordo com o status vacinal do rebanho. Dentre os 147 animais vacinados, 74,8% possuíam títulos de anticorpos contra BoHV-1, 53% contra BVDV e 52,3% contra *Leptospira* spp. A vacinação não conferiu imunidade protetora em mais de 40% dos bovinos. Entre os 258 animais não vacinados, 9,3% foram positivos pra BoHV-1, 11,2% para BVDV, 12% para *Leptospira* spp. e 37,3% para *N. caninum*. Os resultados demonstraram que município de Novo Xingu apresentou baixa prevalência de infecção por BoHV-1, BVDV e *Leptospira* spp, com valores até 80% menores em relação à média da região sul do país. Em contrapartida observou-se acentuada ocorrência de infecção por *Neospora caninum*, 57% maior em relação à mesma média. Tiveram associação à soropositividade dos animais as variáveis: histórico de aborto, histórico de retorno ao cio, utilização de piquete maternidade, mães ou avós com histórico de aborto e presença de animais silvestres. Houve também correlação das variáveis histórico de aborto e mães ou avós com histórico de aborto entre si, provavelmente decorrente de transmissão vertical entre os animais. A baixa titulação de anticorpos conferida pelas vacinas comerciais, sugere a necessidade de estudos controlados sobre a qualidade e eficácia das mesmas. Os resultados dos exames sorológicos foram entregues aos produtores, que receberam uma capacitação sobre particularidades das enfermidades, possibilidades de tratamento, vacinação, destino de envoltórios fetais e demais medidas de controle e prevenção a serem adotadas em cada propriedade.

Palavras-chave: doenças reprodutivas; soroepidemiologia; vacinas; fatores de risco.

Abstract

ZARDO, Róber. **Prevalence and associated variables with BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. and *Neospora caninum* infection in dairy cattle, in Novo Xingu county, Rio Grande do Sul state.** 2017. 96f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Infectious reproductive diseases cause great economic losses to livestock production due to the occurrence of abortions, embryonic losses and production decrease. Thus, establishing an estimate of the distribution of these diseases in the herd is fundamental in the adoption of prevention and control measures. This study aimed to investigate the seroprevalence of antibodies against BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. and *Neospora caninum* in the dairy herd of the municipality of Novo Xingu, determined by seroneutralization, microscopic agglutination test, immunofluorescence and ELISA, respectively. A total of 405 serum samples of dairy cattle from 109 herds were collected and the variables associated with infection by each agent were determined. Samples were divided into two categories according to the herd's vaccine status. Among the 147 vaccinated animals, 74.8% had antibody titers against BoHV-1, 53% against BVDV and 52.3% against *Leptospira* spp. Vaccination did not confer protective immunity in more than 40% of bovines. Among the 258 unvaccinated animals, 9.3% were positive for BoHV-1, 11.2% for BVDV, 12% for *Leptospira* spp. and 37.3% for *N. caninum*. The results showed that the municipality of Novo Xingu presented low prevalence of infection by BoHV-1, BVDV and *Leptospira* spp., with values up to 80% lower than the average of the southern region of the country. In contrast, there was a marked occurrence of *Neospora caninum* infection, 57% higher than the same average. The following variables were associated with the seropositivity of the animals: history of abortion, history of return to estrus, use of a maternity picket, mothers or grandparents with a history of abortion and presence of wild animals. There was also a correlation between history of abortion and mothers or grandparents with a history of abortion, probably due to vertical transmission between the animals. The low titers of antibodies conferred by commercial vaccines suggest that it necessary controlled studies about their quality and efficacy. The results of the serological tests were made available to the farmers, who received training on the particularities of the diseases, treatment possibilities, vaccination, destination of fetal membranes and other measures of control and prevention to be adopted in each property.

Keywords: reproductive diseases; seroepidemiology; vaccines; risk factors.

Lista de Figuras

Figura 1 Ilustração esquemática da morfologia e estrutura de uma partícula vírica da família Flaviviridae..... 15

Figura 2 Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes pelo BVDV, de acordo com o biótipo do vírus e com o estágio de gestação..... 20

Figura 3 Ilustração simplificada de uma partícula vírica da família Herpesviridae..... 24

Figura 4 (A) Microscopia eletrônica de varredura de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. (B) Leptospiras sp. vistas ao microscópio de campo escuro (200x)..... 33

Figura 5 Cisto tecidual contendo bradizoítos de *N. caninum*..... 42

Figura 6 Oocistos de *N. caninum* contendo esporozoítos não esporulados (A) e esporulados (B), em seu interior..... 43

Figura 7 Taquizoítos de *N. caninum*..... 44

Lista de Tabelas

Tabela 1 Estudos sorológicos realizados acerca da prevalência da infecção pelo BVDV em bovinos na região sul do Brasil (2000-2015) 17

Tabela 2 Relação de fatores de risco para infecção pelo BVDV em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 1999 e 2016..... 18

Tabela 3 Estudos sorológicos realizados acerca da prevalência da infecção pelo Herpesvirus Bovino Tipo-1 (BoHV-1) na região sul do Brasil (1995-2015) 26

Tabela 4 Relação de fatores de risco para infecção pelo BoHV-1 em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 1995 e 2014..... 28

Tabela 5 Estudos sorológicos sobre a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos da região sul do Brasil..... 36

Tabela 6 Relação de fatores de risco para infecção por *Leptospira* spp. em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 2003 e 2014..... 38

Tabela 7 Estudos sorológicos sobre a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos da região sul do Brasil (2001-2013)..... 46

Tabela 8 Relação de fatores de risco para infecção por *N. caninum* em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 1999 e 2015..... 47

Lista de Abreviaturas e Siglas

BoHV	Herpesvirus Bovino
BVD	Diarreia Viral Bovina
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
CP	Citopático
ELISA	Ensaio Imuno-enzimático
HD	Hospedeiro Definitivo
HI	Hospedeiro Intermediário
IBP	Balanopostite Infecsiosa Bovina
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IFN	Interferon
IPV	Vulvovaginite Infecciosa Bovina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Técnica de Aglutinação Microscópica
NCP	Não-citopático
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Persistentemente Infectados
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SN	Soroneutralização
TNF	Fator de Necrose Tumoral

Sumário

1 Introdução..... 12
2 Revisão da Literatura..... 15
2.1 Diarreia Viral Bovina..... 15
2.1.1 Agente Etiológico..... 15
2.1.2 Epidemiologia..... 17
2.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos..... 19
2.1.4 Diagnóstico..... 21
2.2 Rinotraqueíte Infeciosa Bovina..... 23
2.2.1 Agente Etiológico..... 23
2.2.2 Epidemiologia..... 25
2.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos..... 29
2.2.4 Diagnóstico..... 31
2.3 Leptospirose..... 31
2.3.1 Agente Etiológico..... 31
2.3.2 Epidemiologia..... 34
2.3.3 Patogenia e Sinais Clínicos..... 39
2.3.4 Diagnóstico..... 40
2.4 Neosporose..... 41
2.4.1 Agente Etiológico e ciclo biológico..... 41
2.4.2 Epidemiologia..... 44
2.4.3 Patogenia e Sinais Clínicos..... 47
2.4.4 Diagnóstico..... 48
3 Artigo..... 50
4 Considerações Finais..... 67
Referências..... 68
Anexos..... 90

1 Introdução

A pecuária leiteria brasileira destaca-se no cenário internacional ocupando o quinto lugar em produção de leite, com aproximadamente 30.523 toneladas em 2015 (OECD/FAO, 2016). Contudo, os índices de produtividade brasileiros encontram-se muito aquém quando comparados aos países desenvolvidos, principalmente levando-se em conta as tecnologias disponíveis e as condições climáticas do país (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006; SIQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Para gerar bons índices de produtividade é crucial que o rebanho tenha um bom desempenho reprodutivo, com intervalos entre partos próximos a um ano (PEREIRA et al., 2014; VIEIRA, 2014). No entanto, diversos fatores como problemas de manejo nutricional, genéticos, ambientais e infeciosos podem ocasionar desordens reprodutivas nestes animais, com manifestações clínicas que envolvem morte embrionária ou fetal, repetições de cio, abortos, mumificação fetal e natimortos. Todas essas implicações, independentemente de sua etiologia, são responsáveis por extensas perdas econômicas na cadeia produtiva de bovinos, uma vez que diminuem os índices de prolificidade e produtividade do rebanho (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006).

Mesmo sendo multifatorial, estima-se que as causas infecciosas sejam responsáveis por mais de 30% dos casos de perdas gestacionais em bovinos. Entre os principais agente infecciosos envolvidos estão o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), o herpesvirus bovino tipo-1 (BoHV-1), a *Leptospira* spp. e o *Neospora caninum* (GIVENS, 2006).

A diarreia viral bovina (BVD) é uma das doenças víricas de maior impacto em bovinocultura, pois além de uma série de manifestações clínicas que incluem desordens digestivas e reprodutivas, causa uma diminuição da resposta imune do hospedeiro, favorecendo o aparecimento de infecções secundárias (DIAS; SÂMARA, 2010). Animais persistentemente infectados são os principais disseminadores da doença uma vez que eliminam, de maneira permanente, grandes quantidades de vírus ao longo da sua vida (RIDPATH; FLORES, 2007).

O BoHV-1 acomete o trato respiratório e reprodutor dos bovinos, sendo responsável pela rinotraqueíte infecciosa bovina, além da vulvovaginite pustular

infecciosa e balanopostite pustular infecciosa (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Uma característica do BoHV, assim como outros membros de sua família, é a capacidade de estabelecer latência nos gânglios nervosos sensoriais, o que possibilita sua reativação em condições de diminuição da resposta imune do hospedeiro (JONES, 2003).

A leptospirose é uma antropozoonose de distribuição mundial que acomete várias espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem (BHARTI et al., 2003). É causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, distribuídas em mais de 20 espécies, das quais pelo menos 9 são patogênicas. Mais de 300 sorovares já foram identificados (BOURHY et al., 2014). A colonização dos túbulos renais e a consequente eliminação da bactéria pela urina é a principal responsável pela contaminação do ambiente e fonte de infecção para outros animais e humanos (RADOSTITS et al., 2000).

Neospora caninum é considerado uma das causas infecciosas mais importantes de abortos em bovinos em todo o mundo, responsável por perdas econômicas globais em torno de US$ 2 bilhões/ano na pecuária de leite e de corte (REICHEL et al., 2013). A neosporose encontra-se amplamente distribuída por vários estados brasileiros e, segundo estimativas, mais de 474 mil abortos podem estar ocorrendo na pecuária leiteira brasileira devido à doença (NICOLINO et al., 2015). O parasito tem como seu principal hospedeiro definitivo (HD) os cães, mas várias espécies de animais já foram identificadas como hospedeiros intermediários (HI). Apesar de possuir ciclo biológico heteróxeno, os bovinos não precisam de contato com o HD para que haja a permanência do parasito no rebanho, uma vez que grande parte das infecções são transmitidas de maneira vertical durante a gestação (DUBEY; SCHARES, 2011).

Identificar os agentes etiológicos presentes na propriedade é fundamental para estabelecer as ferramentas de controle sanitário ideais, adotar esquemas de vacinação de acordo com a realidade local e reduzir custos de produção, além de evitar a disseminação de patógenos no rebanho e, dependendo do caso, a transmissão ao ser humano (ORLANDO, 2013). Entretanto, as regiões brasileiras apresentam diferenças significativas, quanto a densidade de animais, tipo de exploração rural, tipo de manejo e condições climáticas, influenciando na gravidade e na prevalência da doença em determinadas populações. Assim, o referencial teórico

desta pesquisa baseou-se apenas em estudos de prevalência realizados na região sul do Brasil, pela homogeneidade das condições geográficas e de manejo existentes.

Devido a essa grande variabilidade, estudos locais de prevalência destas enfermidades são necessários para melhor estimar sua ocorrência. No entanto, poucos estudos foram realizados na região noroeste do RS, e nenhum nas proximidades do município de Novo Xingu, levando a uma escassez de dados estatísticos sobre o assunto daquela localidade. Desta maneira, o presente estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar a condição sanitária do rebanho leiteiro do município, frente a infecção pelo Herpesvirus Bovino Tipo-1, vírus da diarreia viral bovina, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum*. Além de determinar, através de um questionário epidemiológico, os aspectos relacionados à essas infecções e o nível de associação entre eles. Assim foi possível estimar a prevalência das doenças, avaliar os títulos de anticorpos vacinais e identificar os principais fatores de risco nos rebanhos analisados.

2 Revisão da Literatura

2.1 Diarreia Viral Bovina

2.1.1 Agente etiológico

A diarreia viral bovina (BVD) é uma enfermidade causada pelo BVDV ("Bovine Viral Diarrhea Virus"), membro da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, um dos menores vírus envelopados causadores de infecção em animais, com 40 a 60 nanômetros de diâmetro. É um RNA vírus de fita simples e sentido positivo, protegido por um capsídeo proteico icosaédrico e envolto por um envelope de composição lipoprotéica derivado das membranas das células hospedeiras (Fig.1) (FLORES, 2007).

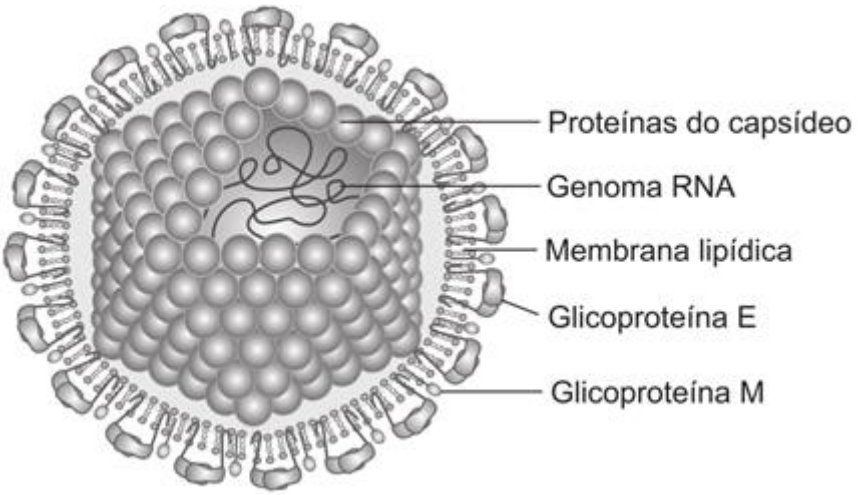


Figura 1. Ilustração esquemática da morfologia e estrutura de uma partícula vírica da família *Flaviviridae*. Fonte: (RIDPATH; FLORES, 2007)

Devido à grande variabilidade genética e antigênica existente, o vírus é dividido em três genótipos distintos: BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3. O principal fator responsável é atribuído à presença de uma região hipervariável na porção N-terminal da glicoproteína E2, uma proteína estrutural do envelope viral responsável pela adsorção do vírus a receptores específicos nas células (SIMMONDS, et al., 2011). Apesar de

a maioria das cepas de referência e utilizadas em vacinas serem do genótipo 1, na região sul do Brasil 42,2% dos isolados são do genótipo 2 (WEBER et al., 2014). Isso dificulta o estabelecimento de ferramentas corretas de diagnóstico e controle da enfermidade devido ao baixo índice de imunidade cruzada entre os dois (ABE et al., 2016).

O BVDV é classificado em dois biótipos: citopático (CP) e não citopático (NCP) de acordo com sua capacidade de produzir citopatologia em cultivo celular. O NCP é o mais encontrado em amostras de campo e também o único que atravessa a placenta podendo causar o nascimento de bezerros imunotolerantes ao vírus e por isso persistentemente infectados (PI) (RIDPATH; FLORES, 2007). Entretanto, nos animais PI, a imunotolerância é exclusiva e específica aos epítopos presentes na estirpe viral responsável pela infecção (BREWOO et al., 2007). Além disso, mesmo que células infectadas pelo BVDV não produzam interferon (IFN) em resposta a infecções por vírus heterólogos, o IFN produzido por células não infectadas pode ainda proteger tanto estas quantos as que se encontram persistentemente infectadas pelo vírus (SCHWEIZER et al., 2006).Deste modo, infecções causadas por cepas heterólogas do mesmo vírus podem gerar uma resposta imune tanto inata quanto adaptativa, devido ao reconhecimento de diferentes epítopos presente no novo isolado (BREWOO et al., 2007; SCHWEIZER et al., 2006).

Todavia, ocasionalmente o genoma dos vírus NCP pode sofrer inserções ou deleções de genes, gerando mutantes CP. Quando um indivíduo PI é reinfectado por uma variante CP do vírus, geralmente originado a partir de mutações do BVDV (NCP) presente no animal, há o desenvolvimento da Doença das Mucosas. Enfermidade caracterizada por uma gastroenterite grave e quase sempre fatal que, devido à estas condições, acomete apenas animais PI (FLORES, 2007).

O vírus é sensível à pH ácido, mantendo-se estável às variações de pH entre 5,7 a 9,3. Devido à composição de seu envelope, são rapidamente inativados por solventes orgânicos, detergentes, fenóis e hipoclorito de sódio. É estável à baixas temperaturas, preservando sua infectividade por anos quando mantido a temperaturas inferiores a -70ºC, contudo é facilmente inativado pelo calor. Devido à estas características, possui baixa resistência no ambiente, permanecendo viável por apenas alguns dias (FENNER et al., 1993; RIDPATH, 2005).

2.1.2 Epidemiologia

Os primeiros levantamentos epidemiológicos da ocorrência de BVDV no Brasil ocorreram no Rio Grande do Sul. No início da década de 70, Wizigmann et al. fizeram o primeiro estudo sorológico e em 1974 Vidor et al., conseguiram isolar o agente etiológico da BVD a partir do sangue de um feto coletado em um matadouro no estado (VIDOR et al., 1974; FLORES et al., 2005). Desde então, diversos estudos de prevalência têm sido realizados em várias regiões, demonstrando a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro. (FLORES et al., 2005). A prevalência média nos estados, de acordo com os autores, foi de 73,5% no Paraná, 43,4% em Santa Catarina e 45,6% no Rio Grande do Sul (Tab.1).

Embora os bovinos sejam considerados seus hospedeiros naturais, o vírus não é espécie específico sendo capazes de infectar uma ampla gama de espécies de animais domésticos e silvestres (LINDBERG, 2003).

Tabela 1. Estudos sorológicos realizados acerca da prevalência da infecção pelo BVDV em bovinos na região sul do Brasil (2000-2015).

Origem	Características da amostra	n*	Pos.*	Prev.*	Referência
PR	Bovinos de corte e leite	937		73,47%	MÉDICI et al. (2000)
RS	Bovinos leiteiros	1335	682	51%	SCHERER et al. (2002)
RS	Bovinos leiteiros de 28 propriedades	204	60	29,4%	POLETTO et al. (2004)
RS	Tanques coletivos de leite	11.711	1.028	8,8%**	BRUM et al. (2004)
RS	Bovinos de 1264 propriedades	14.535	5.717	39,33%	WEIBLEN (2004 apud FLORES et al., 2005)
RS	Bovinos de 17 municípios	697	410	58,8%	VIDOR (2004 apud FLORES et al., 2005)
RS	Animais de 85 propriedades	1734	1.150	66,32%	QUINCOZES et al. (2007)
RS	Bovinos leiteiros	765	442	57,7%	FRANDOLOSO et al. (2008)
SC		309	180	58,25%	FINO et al. (2013)
RS	Bovinos de corte e leite de	1083	580	53,5%	BECKER et al. (2015)
SC	Fêmeas com problemas reprodutivos	842	240	28,5%	PASQUALOTTO et al. (2015)

*n: número de amostras testadas; Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência;** % dos rebanhos

Múltiplas variáveis associadas ao aumento da prevalência da infecção, podem ser consideradas como fatores de risco e têm sido estudadas por diversos pesquisadores (Tab. 2). Muitas destas condições podem estar associadas à disseminação do vírus dentro e entre rebanhos, cuja velocidade depende da prevalência da infecção no local, da densidade da população animal e de características intrínsecas do agente, como estirpe e virulência (THURMOND, 2005).

Tabela 2. Relação de fatores de risco para infecção pelo BVDV em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 1999 e 2016.

Autores	Fatores de risco
VALLE et al. (1999)	Compra de animais, uso de pasto em comum, o contato entre rebanhos através das cercas de pastagem, o trânsito de animais, a falta de assistência técnica e troca de bezerros entre os agricultores
MAINAR-JAIME et al. (2001)	Idade, raça, distância entre fazendas, produção de leite e origem da vaca.
BARBOSA; BRITO; ALFAIA (2005)	Idade dos animais.
QUINCOZES et al. (2007)	Exploração mista, criação extensiva, realização de ordenha mecânica, uso de inseminação artificial ou de inseminação artificial associada à monta natural, uso de piquete de parição e ausência de assistência veterinária.
TALAFHA et al. (2009)	Tamanho do rebanho, ausência de piquete maternidade, trânsito de trabalhadores entre propriedades e a falta de quarentena de animais recém adquiridos antes da adição ao rebanho.
CHAVES et al. (2010)	Produção de leite (1-5L), ausência de assistência veterinária, uso de monta natural e monta natural associada à inseminação artificial.
CHAVES et al. (2012)	Presença de suínos, ausência de assistência veterinária, uso de monta natural ou de monta natural associada à inseminação artificial e diarreia.
ALMEIDA et al. (2013)	Uso de inseminação artificial e tamanho do rebanho
GRAHAM et al. (2013)	Tipo de exploração (leite), número de vacas no rebanho, o percentual de mortalidade de bezerros até 28 dias após o nascimento e o número de bovinos adquiridos.
SOUSA et al. (2013)	Volume de produção de leite (1 -5 litros).
WEBER et al. (2014)	Presença de ovelhas na propriedade
MACHADO et al. (2016)	Contato entre animais de propriedades vizinhas e manejo reprodutivo (monta natural).

Os animais infectados eliminam o vírus através de secreções nasais e oculares, saliva, urina, fezes, fluidos uterinos, envoltórios fetais e sêmen (RADOSTITS et al., 2000). O modo de infecção mais comum ocorre pelo contato do vírus com as mucosas através da ingestão ou inalação de partículas virais. A transmissão indireta pode ocorrer por procedimentos de vacinação com reutilização de agulhas, através de equipamentos e utensílios, reutilização de luvas de palpação retal, pela contaminação de currais ou ainda através de insetos hematófagos. Mesmo que os animais sejam mantidos em baias separadas, pode ocorrer transmissão pelo ar à distâncias de até 10 metros (LANG-REE et al., 1994; NISKANEN; LINDBERG, 2003; THURMOND, 2005). A transmissão vertical ocorre em fêmeas PI ou quando fêmeas imunotolerantes entram em contato com o vírus durante a gestação, desenvolvendo infecção aguda. Nos dois casos há infecção transplacentária do feto (LARSON, 2005). A existência de animais PI, que eliminam grandes quantidades de vírus no ambiente, pode resultar na rápida disseminação do vírus entre a maioria dos bovinos susceptíveis, constituindo o meio mais comum e efetivo de transmissão do agente (FLORES, 2007).

2.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos

A patogênese da infecção é complexa e depende de múltiplos fatores como o status imunológico do hospedeiro, a cepa do vírus envolvido, a idade do animal, ocorrência de infecção transplacentária e ocorrência de infecções secundárias (RADOSTITS et al., 2000; FLORES et al., 2005). O vírus penetra principalmente pela mucosa oronasal e se multiplica no epitélio do trato respiratório superior e linfonodos regionais, ocorrendo viremia de 3 a 10 dias após a infecção inicial. O agente possui tropismo por células com alta taxa de divisão, por isso ao se espalhar sistemicamente, migra principalmente para as placas de Peyer no intestino e para o feto onde inicia o processo de multiplicação. Durante esta fase acontece a liberação máxima de partículas virais, atingindo seu pico de 12 a 42 horas após a infecção (LANYON et al., 2014).

Com a infecção do epitélio do trato digestório, há o surgimento de úlceras na porção superior, inflamação e edema do abomaso e hiperemia do intestino delgado, com presença de conteúdo líquido com estrias de muco e células de descamação no seu interior. O epitélio das criptas do abomaso e intestino apresenta-se necrótico com extensa perda celular (CARLTON; MCGALVIN, 1998). Animais infectados

desenvolvem leucopenia e trombocitopenia, acarretando uma imunossupressão especialmente celular e favorecendo o aparecimento de doenças secundárias (LINDBERG, 2003). Isso ocorre porque o BVDV invade células fundamentais no controle da resposta imune inata e adquirida, incluindo granulócitos, macrófagos, células mielóides apresentadoras de antígenos e linfócitos T e B. Como consequência, ocorre principalmente uma diminuição da fagocitose e da produção de imunoglobulinas bem como da expressão de seus receptores. Além disso, a invasão dos macrófagos gera uma diminuição de citocinas como TNF-α (fator de necrose tumoral) e IFN-γ (interferon), principais mediadores químicos na resposta anti-viral (CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004).

Em animais prenhes os principais sinais clínicos são: abortos, mumificação fetal, nascimento de bezerros fracos ou natimortos, decréscimo na taxa de concepção e queda na produção de leite, entre outros (RADOSTITS et al., 2000). Entretanto, os efeitos da infeção dependem do biótipo e estirpe do vírus, e do período gestacional em que ocorre (Fig. 2).

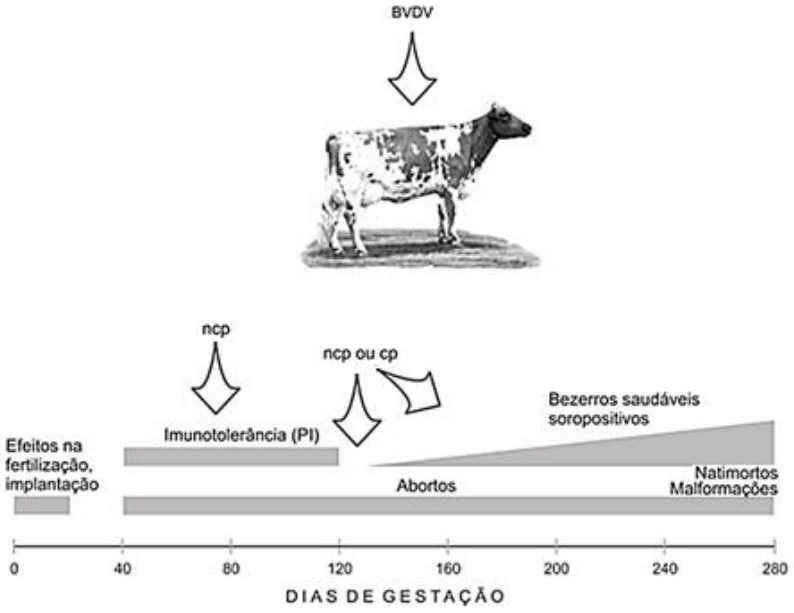


Figura 2. Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes pelo BVDV, de acordo com o biótipo do vírus e com o estágio de gestação. Fonte: Adaptado de RIDPATH; FLORES (2007)

Quando a infecção acontece durante as primeiras três semanas de gestação, não há infecção do embrião pois o BVDV parece não ser capaz de penetrar na zona pelúcida. No entanto, após o desenvolvimento dos cotilédones, uma infecção da mãe pode resultar em infecção e morte embrionária (MOENNIG; LIESS, 1995). Quando o

embrião ou feto é infectado por cepas NCP entre o 40º e 120º dia de gestação, seu sistema imunológico ainda reconhece os antígenos virais como próprios e por isso é incapaz de montar uma resposta contra o vírus. Isso resulta no nascimento de bezerros PI que excretam o vírus continuamente em suas secreções e excreções (FLORES, 2007). Infecções entre o 80º e 150º dia de gestação pode levar a efeitos teratogênicos ou à morte fetal e aborto sem qualquer efeito sobre a vaca (MOENNIG; LIESS, 1995).

Em animais imunocompetentes e fêmeas não gestantes a infecção é na maioria das vezes assintomática, mas ocasionalmente, estirpes de maior patogenicidade podem provocar doença clínica. Os sinais clínicos são geralmente transitórios, iniciando aproximadamente uma semana após a infecção, e incluem febre, inapetência, diminuição na produção leiteira e lesões em mucosas associadas com quadros respiratórios e gastrointestinais (FINO et al., 2012a). A doença clínica aguda ocorre principalmente em bezerros imunocompetentes, entre 6 e 24 meses quando há uma diminuição da imunidade colostral, sem a presença de imunidade adquirida ao vírus (THURMOND, 2005).

A doença das mucosas (DM) ocorre quando um animal PI é infectado com uma amostra de BVDV-CP, geralmente originado de mutações do BVDV-NCP do próprio animal. A DM é uma doença aguda e quase sempre fatal, ocorrendo principalmente em animais entre seis meses e dois anos de idade. É caracterizada por diarreia, inapetência, desidratação, lesões erosivas nas narinas e na boca e morte dentro de poucos dias (FLORES, 2007).

2.1.4 Diagnóstico

Devido à diversidade de manifestações clínicas, que vão desde uma forma inaparente até uma síndrome fatal, um diagnóstico conclusivo só poderá ser obtido com o auxílio de testes laboratoriais. O método de eleição deverá levar em conta o objetivo clínico da investigação, as condições do rebanho e do número de amostras a serem analisadas (DIAS et al., 2010). Dentre as possibilidades inclui-se o isolamento viral, imunofluorescência, imunohistoquímica, soroneutralização e ELISA, além de técnicas moleculares baseadas na detecção de ácidos nucléicos virais como RT-PCR, *Southern blot*, *Northern blot* e *dot /slot blot* (FLORES, 2007).

Quando o objetivo da investigação é a erradicação do BVDV do rebanho, é imprescindível a detecção do vírus ou antígeno específico, por ser a única maneira de identificar e posteriormente eliminar os animais PI presentes no efetivo (LANYON et al., 2014). O isolamento viral ainda é considerado pela OIE como padrão ouro para o diagnóstico do BVDV. A técnica amplia as possibilidades de um diagnóstico final, uma vez que pode ocasionalmente identificar outros vírus que não faziam parte da presunção inicial (DUBOVI, 2013). Como a maioria dos BVDV isolados são do biótipo NCP, o teste deverá incluir análises por imunofluorescência ou imunohistoquímica, utilizando anticorpos marcados para identificação do antígeno viral (SALIKI; DUBOVI, 2004).

Atualmente a RT-PCR tem sido amplamente utilizada como padrão, por ter boa sensibilidade e especificidade, além de ser mais rápida, mais barata e não exigir instalações para cultivo celular (LANYON et al., 2014; MARTIN et al., 2016). A RT-PCR pode ainda ser utilizada como teste de triagem em rebanhos leiteiros através de amostra de leite de tanques, reduzindo drasticamente o tempo e o custo da identificação destes animais no rebanho (HILL et al., 2010).

A imunohistoquímica também é largamente usada para confirmar a presença de animais PI em rebanhos, através de amostras de tecidos (ANDRADE et al., 2005; HILBE et al., 2007). Sua principal vantagem é a possibilidade de identificação de animais PI sem que haja a interferência de anticorpos colostrais, e sem a necessidade de fixação na preparação dos fragmentos de pele (SALIKI; DUBOVI, 2004).

O ELISA de captura de antígeno é o método de detecção antígeno específico mais simples e rápido, e por isso o mais utilizado na rotina clínica, principalmente como método de rastreio. Pode ser usado com amostras de soro, leite ou tecido de orelha, com sensibilidade e especificidade que variam de 67% a 100% e 98,8% a 100%, respectivamente, quando comparados com o isolamento do vírus (LANYON et al., 2014; SALIKI; HUCHZERMEIER; DUBOVI, 2000).

Ferramentas de diagnóstico baseadas na detecção de anticorpos em animais expostos ao vírus, seja através de infecção natural ou vacinação, são amplamente utilizadas e envolvem principalmente as técnicas de soroneutralização (SN) e ELISA (SALIKI; DUBOVI, 2004). Contudo, a positividade indica apenas que houve uma exposição prévia ao agente viral, não sendo possível a diferenciação entre infecção natural ou vacinação. Por isso, em rebanhos vacinados o valor do teste é limitado, constatando apenas o status sorológico e a eficácia da vacina. Animais PI, por não

possuírem ou apresentarem baixos níveis de anticorpos contra o vírus, não são identificados por métodos sorológicos, devendo serem submetidos a ensaios de detecção de vírus ou de antígenos virais (RT-PCR, ELISA) (LANYON et al., 2014; LINDBERG, 2003).

A soroneutralização é o teste padrão para detecção de anticorpos anti-BVDV do biótipo citopático. A técnica baseia-se na quantificação do efeito inibitório dos anticorpos na replicação do vírus na cultura celular, através da avaliação da presença de efeito citopático em diversas diluições de soro (SANDVIK, 2005). A atividade neutralizante cruzada entre os diferentes genótipos virais é reduzida ou até mesmo indetectável na SN, principalmente quando baixos níveis de anticorpos estão presentes. Deste modo, como as estirpes de referência utilizadas, “NADL” ou “Oregon C24V”, são do genótipo 1 do BVDV, infecções causadas por estirpes de campo diferentes destas, podem não ser detectadas pelo teste de SN (GIANGASPERO et al., 1988). Contudo, apesar de ambas as variações de genótipos e biótipos serem resultado de mutações genéticas, apenas as diferenças virais genotípicas tem significância para a detecção e controle através de soroneutralização, já que os dois biótipos são antigenicamente idênticos e por isso indistinguíveis sorologicamente (RIDPATH, 2003).

2.2 Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

2.2.1 Agente etiológico

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), a Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IPV) e a Balanopostite Pustular Infecciosa (IBP) fazem parte de um complexo de enfermidades causadas pelo Herpesvirus Bovino Tipo-1 (BoHV-1). Um vírus cujo genoma é composto por uma molécula de DNA fita dupla linear (Fig. 3), envelopado, pertencente à Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae* e Gênero *Varicellovirus* (FLORES, 2007; KING et al., 2012).

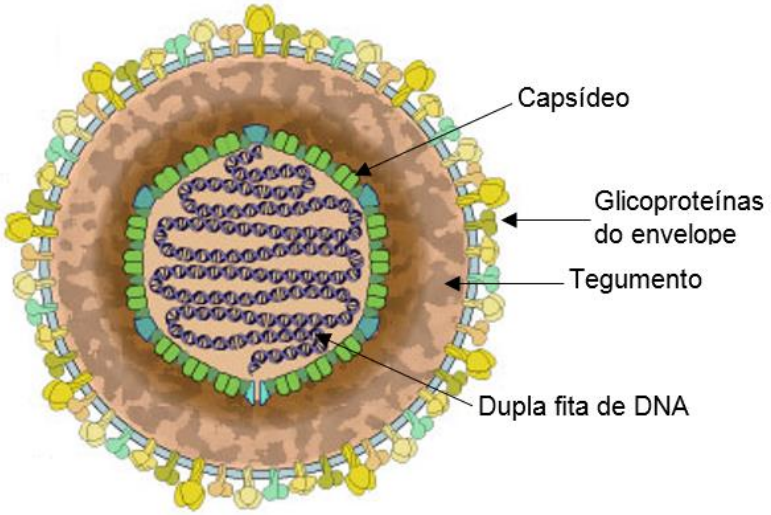


Figura 3. Ilustração simplificada de uma partícula vírica da família *Herpesviridae*.
Fonte: Adaptado de: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/178.html

O BoHV-1 pode ser subdividido em três diferentes genótipos, baseado em suas características genômicas e antigênicas: BoHV-1.1 geralmente associado à sinais respiratórios clássicos da IBR, abortos e infertilidade; BoHV-1.2a relacionado à IPV e IBP e também manifestações respiratórias e BoHV-1.2b menos patogênico e incomum no Brasil, geralmente associado apenas à doença respiratória leve (FLORES, 2007). Entretanto, a associação de um subtipo com cada quadro clínico não é de natureza exclusiva e o desenvolvimento de rinotraqueíte ou vulvovaginite/balanopostite depende mais da via de infecção do que do subtipo do vírus (OIE, 2016a). O BoHV-1 não possui hospedeiro específico, tendo sido encontrado em uma ampla variedade de mamíferos (KING et al., 2012).

As espécies BoHV-1 e BoHV-5 são genética e antigenicamente relacionadas, razão pela qual existe um alto grau de reatividade sorológica cruzada entre elas. A similaridade gênica entre as glicoproteínas do envelope viral é em média de 82%, chegando a 98% para a glicoproteína D (gD) (DELHON et al., 2003). Contudo, apesar desta correspondência, o BoHV-1 e o BoHV-5 possuem diferentes capacidades de invadir o tecido nervoso (GABEV et al., 2010). Enquanto o BoHV-5 é capaz de infectar diferentes regiões do cérebro causando meningoencefalite, o BoHV-1 normalmente não ultrapassa os gânglios nervosos, onde estabelece infecção latente, embora ocasionalmente, o BoHV-1 pode ser detectado no sistema nervoso central de bovinos (VOGEL et al., 2003). Uma importante característica biológica desses vírus é sua capacidade de estabelecer latência nos gânglios sensoriais, caracterizada pela presença do genoma viral inativo no núcleo dos neurônios, sem expressão gênica ou

produção de progênie viral. Os animais infectados tornam-se portadores assintomáticos e o vírus permanece ali por toda a vida do animal. Em situações de estresse ou imunossupressão como parto, febre dos transportes, manejo intenso ou tratamento com corticosteroides, pode haver uma reativação do vírus levando a uma infecção ativa e reexcreção de partículas infectantes (JONES, 2003).

2.2.2 Epidemiologia

Bovinos de todas as idades são suscetíveis ao BoHV-1, porém a infecção ocorre com maior frequência em animais acima de seis meses de idade. A infecção por este vírus apresenta elevada morbidade, no entanto a morte é um evento raro e geralmente decorrente de complicações causadas por infecções secundárias, mantendo a taxa de mortalidade abaixo de 5% (FLORES, 2007). As maiores concentrações de vírus são encontradas nas secreções respiratórias, oculares e genitais, consistindo nas principais fontes de contaminação pelo BoHV-1. A transmissão ocorre por contato direto com as secreções contaminadas, aerossóis ou indiretamente através de fômites contaminados (FINO et al., 2012b; NANDI et al., 2009). Há também transmissão através do sêmen, tanto durante a monta natural quanto por inseminação artificial, devido a contaminação do ejaculado quando entra em contato com os vírus presentes na mucosa do prepúcio (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Oliveira et al. (2011) analisaram 57 amostras de sêmen fresco e congelado, de touros de corte do Rio Grande do Sul, e detectaram DNA viral em todas as amostras testadas, sendo 44% positivas para BoHV-1 e 100% positivas para BoHV-5. Logo, todas as amostras positivas para BoHV-1 tinham infecção concomitante com BoHV-5.

Surtos da doença estão normalmente associados a situações de estresse, à reativação viral ou a introdução de animais infectados em rebanhos suscetíveis (FLORES, 2007). O estresse pode induzir o surgimento de sinais clínicos menos severos e com menor tempo de duração do que na infecção clínica, tornando-os menos perceptíveis (VAN REENEN et al., 2000). No entanto, a partir do terceiro dia após reativação já podem ser detectadas partículas virais nas secreções genitais que, embora em títulos inferiores aos detectados na infecção aguda, parecem ser suficientes para infectar outros animais (HENZEL et al., 2008).

Embora o estado de latência viral dificulte a estimativa dos casos de infecção pelo BoHV há estudos realizados utilizando a técnica de PCR podem identificar a presença de DNA viral nos gânglios. Campos et al. (2009) demonstraram a presença de infecção em 87% das amostras coletas em abatedouro, com prevalência de 6,9% para BoHV-1, 17,2% para BoHV-5 e 75,9% para infecção concomitante de BoHV-1 e BoHV-5, no Rio Grande do Sul. Resultados diferentes foram relatados por Oliveira et al. (2015) através da mesma metodologia no estado do Paraná, onde 27,25% dos bovinos eram herpéticos, sendo 14,25% infectados com BoHV-1, 9,75% infectados com BoHV-5 e 3,25% portadores de infecção mista.

A frequência de anticorpos descrita na literatura indica que o BoHV-1 encontra-se disseminado no rebanho bovino de todos os estados da região sul do Brasil, apresentando diferenças significativas de acordo com a localização geográfica (Tab.3).

Tabela 3. Estudos sorológicos realizados acerca da prevalência da infecção pelo Herpesvirus Bovino Tipo-1 (BoHV-1) na região sul do Brasil (1995-2015)

Origem	**Características**	**n**	**Pos.**	**Prev.**	**Referência**
RS	Bovinos leiteiros	7.956	1495	18,80%	LOVATO et al. (1995)
Região Sul	Animais com problemas reprodutivos	2.239	703	31,40%	VIDOR et al. (1995)
PR	Animais com problemas reprodutivos	1.235	540	43,70%	MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI (2000)
Passo Fundo	Bovinos leiteiros	204	67	32,84%	POLETTO et al. (2004)
Santa Vitória do Palmar e Chuí	Bovinos de corte e leite	1.734	540	31,14%	QUINCOZES (2005)
PR	Fêmeas ≥ 24 meses	1.930		64,41%*	DIAS et al. (2008)
RS	Fêmeas ≥ 24 meses	2.200	642	27,00%	HOLZ et al. (2009)
RS	Bovinos de corte	200	88	44,00%	CAMPOS et al. (2009)
PR	Fêmeas ≥ 24 meses	14.803	7125	59,00%	DIAS et al. (2013)
SC	Fêmeas com problemas reprodutivos	842	482	57,54%	PASQUALOTTO at al. (2015)
PR	Bovinos de corte sem sinais clínicos	400	57	14,25%	OLIVEIRA et al. (2015)
Sul do RS	Amostras recebidas no Lab.Vir – UFPel (2013-2014)	1.224	299	24,40%	BECKER et al. (2015)

*n: número de amostras testadas; Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência

No Paraná a frequência média encontrada foi de 46,97%, baseada na análise de mais de 16000 amostras de sangue coletadas em estudos realizados entre os anos de 2000 a 2015 (MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000; DIAS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015). No estado de Santa Catarina, segundo levantamento sorológico realizado no oeste catarinense em 2015, 57,54% dos animais apresentavam títulos de anticorpos contra o BoHV-1. No Rio Grande do Sul foram realizados diversos estudos desde 1995 até 2015, demonstrando uma prevalência média de 30% entre os animais testados (LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995; QUINCOZES, 2005; POLETTO et al., 2004; CAMPOS et al., 2009; HOLZ et al., 2009; BECKER et al., 2015).

A mesorregião noroeste do RS é uma das regiões com menor prevalência de infecção pelo BoHV-1 no estado. Lovato et al. (1995) detectaram na bacia de Passo Fundo, pertencente à referida região, 12% das amostras positivas. Holz et al. (2009) encontrou soropositividade de 19,6% que, embora superior ao encontrado por Lovato et al. (1995), é 35% menor em relação à média estadual e um dos índices mais baixos encontrados no RS. Algumas características de cada propriedade ou de cada rebanho podem influenciar diretamente na disseminação do vírus entre os animais. Em análise retrospectiva de estudos que avaliaram a associação de variáveis com a positividade do rebanho, nota-se que a idade dos animais e a compra de animais para reposição, principalmente reprodutores, tem sido as mais citadas (Tab.4).

Frequências mais altas de infecção têm sido detectadas em animais com mais de 24 meses de idade, provavelmente associada à maior probabilidade de exposição ao vírus com o passar o tempo. Além disso, as mudanças de manejo que ocorrem com o início da vida produtiva e reprodutiva, favorecem aglomerações e o contato mais íntimo entre os animais, aumentando a probabilidade de contagio (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005; DIAS et al., 2008; FREITAS et al., 2014; LOVATO et al., 1995; MELO et al., 2002).

A compra de animais, quando realizada sem controle sanitário, é outro fator altamente relevante na disseminação do BoHV-1. Dias et al. (2008) demonstraram que propriedades que adquirem touros destinados à reprodução tem 2,68 vezes mais chances de ter animais positivos em seus rebanhos. Machos reprodutores possuem alta capacidade de disseminação do BoHV-1, pelo contato direto com um grande número de fêmeas, somado à alta transmissibilidade do vírus por via venérea, além das demais vias de transmissão. Concordando com Boelaert et al. (2005), que

demostrou após estudo de rebanhos na Bélgica, que machos mais velhos e a compra de animais são fatores de risco para a ocorrência de BoHV-1.

Tabela 4. Relação de fatores de risco para infecção pelo BoHV-1 em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 1995 e 2014.

Autores	Fatores de risco
LOVATO et al. (1995)	Idade
VAN SCHAIK et al. (1998)	Compra de animais, as visitas de profissionais, distância até outras fazendas de gado
MELO et al. (2002)	Tipo de exploração (corte/recria) e idade dos animais (>31meses)
BARBOSA; BRITO; ALFAIA (2005)	Idade
BOELAERT et al. (2005)	Para rebanhos de até 50 animais: compra de animais e tamanho do rebanho.
QUINCOZES (2005)	Uso de inseminação artificial
DIAS et al. (2008)	Número (≥23) fêmeas com idade ≥24 meses; compra de reprodutores; uso de pastagens em comum; histórico de aborto nos últimos 12 meses; presença de animais silvestres.
DIAS et al. (2013)	Tipo de exploração (corte), monta natural; compra de animais, aluguel de pasto; existência de piquete maternidade e registros de aborto nos últimos 12 meses.
SOUSA et al. (2013)	Ausência de assistência veterinária.
FREITAS et al. (2014)	Retorno ao cio, reposição de animais oriundos de outros estados/região e a criação de caprinos/ovinos associados com bovinos.

Particularidades da propriedade como tamanho do rebanho, tipo de exploração, presença de ovinos e caprinos, aluguel de pasto, pasto em comum e utilização de piquete maternidade, também são fatores responsáveis pelo aumento na prevalência de infecções pelo BoHV-1 (BOELAERT et al., 2005; DIAS et al., 2008, 2013). Rebanhos maiores possuem maior risco de infecção provavelmente pela maior densidade entre os animais, facilitando o contato com a secreções contaminadas (BOELAERT et al., 2005). Além disso, geralmente nestas propriedades são práticas mais comuns a compra de animais, a participação em exposições e as visitas de profissionais, aumentando o número de variáveis associadas à soropositividade para o BoHV-1 (VAN SCHAIK et al., 1998). Contudo, para Souza et al. (2013) a ausência

de assistência veterinária representa uma variável de associação mais significativa, com risco de 7,71 vezes para a ocorrência da infecção.

Já a presença de caprinos e/ou ovinos e animais silvestres nas propriedades, faz com que estes atuem como carreadores do vírus, tanto de maneira mecânica pela facilidade de trânsito dentro da propriedade, quanto biológicos já que também são considerados reservatórios naturais do vírus, que estabelece nestes animais infecção latente (FREITAS et al., 2014; MOLLEMA et al., 2005; SIX et al., 2001). Os piquetes maternidade, além de serem uma importante ferramenta que auxilia no manejo da vaca e na assistência ao recém-nascido, impedem o contado de outros animais com fluídos e envoltórios fetais. Todavia, o agrupamento de animais sem controle de contaminação cruzada, torna-se um fator facilitador para que outras fêmeas na mesma condição se infectem pelo BoHV-1, principalmente devido a imunossupressão que ocorre durante as fases de pré e pós parto (DIAS et al., 2013).

Embora as manifestações de distúrbios reprodutivos sejam comumente genéricas, foi observado que o retorno ao cio, abortos e o destino inadequado de seus produtos, aumentam as chances de positividade nos animais que apresentavam algum destes sinais clínicos (DIAS et al., 2008, 2013; FREITAS et al., 2014). Em contrapartida, para Sousa et al. (2013) a presença de sinais clínicos reprodutivos não foi considerada fator de associação com a doença.

O tipo de manejo reprodutivo está fortemente relacionado ao risco de infecção pelo BoHV-1. Aspectos como o tipo de acasalamento, a entrada de reprodutores e a utilização de sêmen para inseminação artificial, sem atestado negativo, são considerados fatores importante e apresentam associação positiva com a prevalência da doença (DIAS et al., 2013). O mesmo autor relacionou ainda como fator de risco o uso de monta natural e o aluguel de áreas de pastagem.

2.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

A entrada do BoHV-1 ocorre principalmente pelas mucosas da cavidade nasal, olhos, orofaringe e o trato genital. Ao penetrar no organismo o BoHV-1 inicia um ciclo lítico de replicação nas células do epitélio, onde há destruição celular e aparecimento de sinais clínicos. Em seguida, pode ser transportado via hematógena aos órgãos alvo do sistema digestivo, reprodutivo e nervoso, ou penetrar nas células nervosas e ser transportado pelo fluxo retrógrado do axônio para o corpo do neurônio, onde

estabelece infecção latente (FRANCO et al., 2012). O comportamento do vírus ao penetrar no organismo, em relação à sua replicação ou latência, é definido pelas interações que ocorrem entre ele e a célula hospedeira, baseado na expressão ou não de alguns genes virais e consequentemente a produção de proteínas específicas, responsáveis pela capacidade de replicação do vírus. Embora sua replicação e consequente desenvolvimento de sintomatologia esteja condicionado à essas interações, em todas as infecções haverá o estabelecimento de infecção latente (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

As manifestações respiratórias estão relacionadas a multiplicação do vírus no trato respiratório, e incluem febre, mucosa nasal hiperêmica, descarga nasal serosa ou mucopurulenta, devido a infecção secundária por bactérias, dispneia, tosse e inapetência. Geralmente, há manifestação de conjuntivite caracterizada por secreção lacrimal abundante, e ocasionalmente, podem ser visualizadas pequenas opacidades na junção corneoescleral e pústulas na conjuntiva (RIET-CORREA et al. , 2007)

Nas fêmeas lactantes há queda na produção de leite. Amostras virais de alta virulência como BoHV-1.1 e BoHV-2.1a, podem resultar em morte embrionária e fetal, abortos, endometrite, repetição de cios e retardo no crescimento dos bezerros (FRANCO et al., 2012). O aborto, quando presente, ocorre principalmente entre o quinto e o oitavo mês de gestação, após um período de incubação de aproximadamente três a seis semanas (FLORES, 2007). A forma genital pode produzir nas fêmeas uma variedade de manifestações clínicas, como presença de secreção mucopurulenta, pústulas distribuídas na mucosa que se rompem formando ulcerações, edema, congestão da vulva e dificuldade de micção (HENZEL et al., 2008). Nos machos há o surgimento de orquite, balanopostite, pústulas à semelhança das fêmeas, presença de corrimento e recusa à monta (RIET-CORREA et al., 2007).

O BoHV-1 é um dos agentes envolvidos no Complexo de Doenças Respiratórias dos Bovinos (DRB), comumente chamada “febre do transporte”, uma doença multifatorial que acomete principalmente bezerros submetidos a situações estressantes, como a desmama e o transporte dos centros de recria para os confinamentos (RIET-CORREA et al., 2007).

2.2.4 Diagnóstico

O vírus pode ser isolado das secreções nasais ou genitais e do sêmen de animais durante a fase aguda da infecção, e de órgãos coletados no pós-morte. O teste padrão para detecção do BoHV-1 é o isolamento viral em cultivo celular (OIE, 2016a). Entretanto, a identificação definitiva só poderá ser realizada utilizando-se anticorpos monoclonais, através de neutralização do efeito citopático ou de técnicas de fluorescência. Métodos moleculares também podem ser utilizados tanto para a identificação como diferenciação entre os subtipos virais (OIE, 2016a).

Técnicas sorológicas baseadas na detecção do vírus, componentes do vírus ou ainda anticorpos específicos são amplamente utilizadas para o diagnóstico laboratorial. No entanto, as técnicas sorológicas baseadas na detecção de anticorpos são incapazes de diferenciar infecções causadas pelo BoHV-1 e 5, devido à alta incidência de reação cruzada existente entre os dois. Além disso, durante o período de latência, a baixa expressão viral e consequentemente o baixo título de anticorpos, também dificultam o diagnóstico através de provas sorológicas (VOGEL et al., 2002). Testes sorológicos são amplamente utilizados para detecção de anticorpos anti-BoHV-1, principalmente em inquéritos epidemiológicos, já que a resposta humoral contra o BoHV-1 se dá aproximadamente uma semana após o início da infecção (THIRY et al., 2006).

O teste padrão para o diagnóstico sorológico é a SN, em que a presença do vírus é confirmada pela formação de efeito citopático após 2-4 dias de incubação. O efeito característico de infecção pelo BoHV é desorganização celular, vacuolização e agrupamento de células arredondadas formando pontos com aspecto de “cacho de uva” (BRUM; WEIBLEN, 2012).

2.3 Leptospirose

2.3.1 Agente etiológico

A leptospirose é uma doença causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, pertencentes à família *Leptospiraceae,* da ordem *Spirochaetales*. Até o momento foram descritas mais de 20 espécies diferentes, divididas em três subgrupos de acordo com sua patogenicidade. Dentre elas, nove espécies são patogênicas e

capazes de causar leptospirose no homem e nos animais*: L. interrogans, L. kirschneri, L. borgpetersenii, L. santarosai, L. noguchii, L. weilii, L. alexanderi, L. kmetyi, L. alstonii e L. mayottensis.* Cinco são consideradas intermediárias, capazes de infectar mas causadoras de sinais clínicos mais leves*: L. inadai, L. broomii, L. fainei, L. wolffii e L. licerasiae*. E por fim as espécies saprófitas, isoladas da água e meio ambiente e incapazes de causar doença em humanos e animais: *L. biflexa, L. wolbachii, L. meyeri, L. vanthielii, L. terpstrae, L. idonii e L. yanagawae* (BOURHY et al., 2014).

Devido à limitada diferenciação fenotípica dentro do gênero, foram utilizados critérios antigênicos como base para sua identificação e classificação em sorovares. Estes, foram baseados na variabilidade do lipopolissacarídeo (LPS) de parede, sendo definidos por aglutinação após adsorção cruzada com antígeno homólogo. Até o momento já foram identificados mais de 300 sorovares (BOURHY et al., 2014; PICARDEAU, 2013). Os sorovares que são antigenicamente relacionados têm sido tradicionalmente agrupados em sorogrupos que, embora facilitem o entendimento epidemiológico, não possuem posição taxonômica (LEVETT, 2001).

Contudo, devido a possibilidade de troca de material genético entre os sorovares, existe uma baixa correlação entre a tipagem sorológica e a classificação genética em espécies (SPICKLER; LEEDOM LARSON, 2013). De fato, existem sorovares patogênicos e não patogênicos dentro da mesma espécie. Além disso, estudos recentes demonstraram heterogeneidade genética dentro dos sorovares, de modo que nem o sorogrupo nem o serovar são capazes de predizer de forma confiável as espécies de *Leptospira*, já que um mesmo sorovar pode representar mais de uma espécie (LEVETT, 2001). Por esta e outras razões práticas, o método de classificação por sorovar ainda é amplamente usado na rotina diária (SPICKLER; LEEDOM LARSON, 2013).

As leptospiras são longas, finas, flexíveis e enroladas para o lado direito sobre seu próprio eixo, dando-lhes um formato helicoidal ou em espiral (Fig.4). Medem de 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro e apresentam uma ou ambas extremidades afinadas e curvadas em forma de gancho (LEVETT, 2001). Possuem dois filamentos axiais polares, denominados flagelos periplasmáticos, que ampliam sua capacidade de locomoção conferindo-lhes alta motilidade em meio aquoso (FAINE et al., 1999).

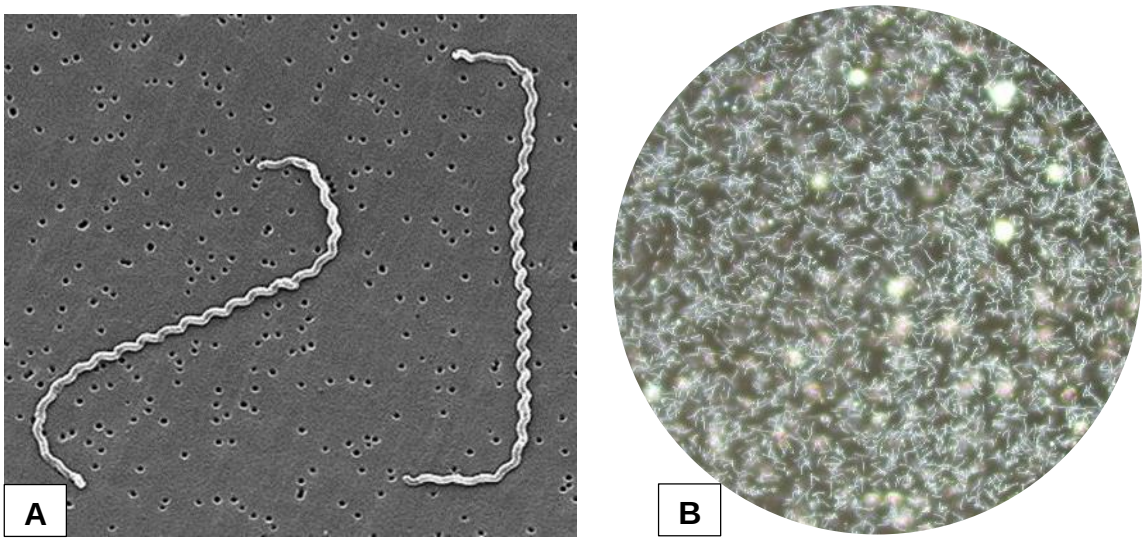


Figura 4. (A) Microscopia eletrônica de varredura de L. *interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. (B) Leptospiras sp. vistas ao microscópio de campo escuro (200x).
Fonte:(A) LEVETT, 2001 (B) www.medicalnewstoday.com/articles/246829.php

São bactérias Gram-negativas e assim como as demais, o LPS é seu principal componente antigênico. No entanto, possui atividades biológicas mais fracas do que o LPS de outras bactérias gram-negativas e por isso baixa endotoxicidade (SHIMIZU et al., 1987). As leptospiras são mais facilmente visualizadas por microscopia de campo escuro ou imunofluorescente, já que não se coram pelas colorações habituais, apenas pelo método de Fontana-Tribondeau em que a parede celular das bactérias é impregnada pela prata (FAINE et al., 1999).

São bactérias aeróbicas estritas, com temperatura ótima de crescimento entre 28 e 30ºC e pH entre 7,2 e 7,4. O meio mais utilizado para o seu cultivo é o meio líquido de Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH). Sua formulação é enriquecida com nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, como ácidos graxos de cadeia longa (Tween 80), sua principal fonte de energia, albumina sérica bovina, ácido oleico, vitaminas B2 e B12, sais de amônio, ferro, fosfato, cálcio e magnésio (ELLINGHAUSEN; MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON; HARRIS, 1967).

As leptospiras são pouco resistentes às condições adversas, sendo rapidamente destruídas em temperaturas entre 50 e 60°C, pela desidratação, pela ação de desinfetantes ou em meio ácido. Tem seu crescimento inibido em pH inferior a 6,8 e superior a 8, e temperaturas abaixo de 10ºC (FAINE et al., 1999). Sob condições adequadas podem sobreviver por longos períodos, sendo frequentemente encontradas na lama, acúmulos de água doce e em órgãos e tecidos de animais vivos

ou mortos (FAINE et al., 1999). Embora apenas as espécies saprófitas se multipliquem no ambiente, as leptospiras patogênicas são capazes de sobreviver por períodos prolongados de tempo em ambientes aquosos. Elas podem detectar o meio viscoso formado por outros microrganismos, sobre os quais formam agregados favorecendo sua sobrevivência no meio ambiente (TRUEBA et al., 2004).

2.3.2 Epidemiologia

Apesar dos roedores serem os principais hospedeiros da leptospirose, uma ampla gama de animais domésticos e silvestres podem ser infectados e carrear o agente. Embora cada sorovar tenha predileção por determinado hospedeiro, eles não são hospedeiro exclusivos podendo infectar outros animais, e do mesmo modo, um hospedeiro pode ser reservatório de diversos sorovares. Esta variedade de hospedeiros, somada à variabilidade antigênica das leptospiras e sua resistência ao meio ambiente, é fundamental para a manutenção da circulação da doença (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999).

Os animais infectados contaminam o solo, a água e os alimentos, através da urina, fetos abortados e corrimentos uterinos. Contudo a urina é a principal fonte de contaminação, uma vez que após a colonização dos rins, as leptospiras passam a ser eliminadas pelos túbulos renais por longos períodos, sobretudo em animais que se tornam portadores convalescentes (MCBRIDE et al., 2005; WYNWOOD et al., 2014). A entrada das leptospiras no organismo ocorre através das mucosas, principalmente nasal, ocular e genital, ou através da pele lesada. Pode haver também transmissão da infecção através do sêmen contaminado, tanto através da monta natural quanto da inseminação artificial. A via oral não é uma via comum de infecção (RADOSTITS et al., 2000).

A prevalência de leptospirose é bastante variável em razão de sua ocorrência estar relacionada aos diversos fatores ambientais e climáticos, sendo mais comum durante as estações quentes e chuvosas. Além disso, existe ainda variação dos sorovares presentes em cada região, e das diferentes relações estabelecidas entre eles e a espécie hospedeira, apresentando diferentes níveis de infectividade, patogenicidade e virulência, de acordo com o grau de adaptação àquela espécie (MARINHO, 2008; SPICKLER; LEEDOM LARSON, 2013).

Estudos sorológicos em bovinos demonstraram que na região sul do Brasil a leptospirose é endêmica e encontra-se amplamente difundida (FAVERO et al., 2001; SARMENTO et al., 2012). A Tab.5 mostra os resultados encontrados por diversos autores e publicados entre os anos de 1995 a 2015, a respeito da prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* nesta região. Em todos os casos os animais foram submetidos à prova sorológica, realizada por meio do Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), visando a detecção de anticorpos e a determinação dos sorovares envolvidos na infecção. Todos consideraram a aglutinação de pelo menos 50% das leptospiras na diluição de soro 1:100 como ponto de corte. A prevalência média encontrada no estado do RS foi de 41,1%, com valores entre 28,1% e 51,7%. Em SC a prevalência média foi de 51,1%, variando entre 25,2% e 79,3%. Já no PR a prevalência média foi de 30,5% com valores entre 13,3% a 43,7%.

As diferenças entre as prevalências obtidas pelos autores podem estar relacionadas às características das amostras coletadas por cada um. Enquanto uns selecionaram animais aleatoriamente, outros basearam-se em amostras enviadas ao laboratório, ou ainda em amostras coletadas de animais que apresentavam sinais clínicos de doença reprodutiva. Todavia, mesmo sendo de caráter subjetivo, estudos epidemiológicos são fundamentais para o conhecimento da realidade de cada região, contribuindo de maneira efetiva para o desenvolvimento de programas de controle destas enfermidades.

Os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção dos sorovares Hardjo e Pomona, no entanto, podem ser hospedeiros acidentais de uma série de sorovares comuns à outras espécies animais (PICARDEAU, 2013). Foram citados 19 sorovares pelos autores analisados, sendo os mais frequentes: Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae e Wolffi. A alta prevalência do sorovar Wolffi ocorreu, em grande parte devido à reação cruzada existente entre ele e o sorovar Hardjo (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; ARDUINO et al., 2009). O isolamento e inclusão de cepas locais na coleção de antígenos empregados no MAT é de fundamental importância para o diagnóstico, epidemiologia e controle da enfermidade. Sarmento et al. (2012) adicionou 10 cepas autóctones isoladas no Brasil na coleção de antígenos do MAT, propiciando um incremento de 6% (594 animais) no número de animais classificados como reagentes pelo teste.

Os fatores de risco estatisticamente significativos, reportados por diversos autores entre os anos de 2003 e 2014, estão descritos na Tab.6.

Tabela 5. Estudos sorológicos sobre a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos da região sul do Brasil.

UF	Características da amostra	Positivo/ Examinados	%	Principais sorovares encontrados	Referência
RS	S/ amostragem probabilística	1.354/3.265	41,5%		BROD et al. (1995)
PR	Fêmeas leiteiras	166/1.253	13,3%	Icterohaemorrhagiae 28,91%; Pomona 21,1%; Bataviae 16,9%; Autumnalis 14,5%; Canicola 11,4%; Hardjo 10,8%; Bratislava 10,2%; Butembo 7,8%; Pyrogenes 7,2%; Hebdomadis 6,6%; Wolffi 6,0%	RODRIGUES et al. (1999)
RS	Recebidas no CPVDF de 1999-2001	1827/5.094	35,8%	Hardjo 66%; Wolffi 22%; Icterohaemorrha-Giae 13%; Hebdomadis 12%; Bratislava 11%; Australis 8,7%; Pomonna 7,9%; Tarassovi 7%; Grippotyphosa 6,2%; Coopenhageni 5%; Pyrogines 3,9%; Autumnalis 3%; Canicola 3%	WESCHENFELDER et al. (2005)
RS	LZB-FMVZ-USP de 1984 a 1997	709/2.451	28,9%	Hardjo 40,4%; Wolffi 8,9%; Pyrogenes 5,4%	FAVERO et al. (2001)
SC	LZB-FMVZ-USP de 1984 a 1997	130/517	25,2%	Hardjo 47,3%; Castellonis+Patoc 5,5%	FAVERO et al. (2001)
PR	LZB-FMVZ-USP de 1984 a 1997	435/1.675	26,0%	Hardjo 45%; Wolffi 12,5%; Pomona 10%	FAVERO et al. (2001)
RS	Recebidas no IPVDF de 1996-2006	9385/18.806	49,9%	Hardjo 46,94%; Wolffi 29,18%; Bratislava 20,09%; Pomona 16,35%; Hebdomadis 16,12%; Copenhageni 14,62%; Australis 13,35%; Icterohaemorragiae 10,39%; Grippotyphosa 10,11%; Autmnalis 10,03%, Tarassovi 8,22%	MESQUITA et al. (2006)

Continuação Tabela 5.

UF	Características da amostra	Positivo/ Examinados	%	Principais sorovares encontrados	Referência
SC	Fêmeas com problemas reprodutivos	186/344	54,1%	Hardjo 68,3%; Butembo 42,5%; Grippotyphosa 31,1%; Icterohaemorragiae 22,4%; Wolffi 20,6%; Canicola 12,4%; Castelloni 10,2%; Pomona 9,4%; Bratislava 9,4%; Australis 4,1%; Tarassovi 2,6%	CAVAZINI et al. (2008)
SC	Recebidas no Demip-UFSM de 2005-2008	2.585/3.945	65,5%	Hardjo 31,36%; Wolffi 10,90%; Butembo 8,36%; Grippotyphosa 6,01%; Icterohaemor-Ragiae 2,94%; Bratislava 2,58%; Pomona 1,67%; Canicola 1,12%; Australis 0,59%	TONIN et al. (2010)
RS	Fêmeas em idade reprodutiva	387/748	51,7%	Hardjo 25,69%; Australis 14,23%; Shermani 9,09%	SARMENTO et al. (2012)
SC	Fêmeas em idade reprodutiva	172/217	79,3%	Hardjo 46,79%; Shermani 21,10%; Grippotyphosa 11,01%	SARMENTO et al. (2012)
PR	Fêmeas em idade reprodutiva	723/1.655	43,7%	Hardjo 25,77%; Shermani 19,38%; Autumnalis 14,98%	SARMENTO et al. (2012)
PR	Fêmeas com mais de 2 anos	647/1.880	34,4%	Hardjo 54,7%; Grippotyphosa 7,74%; Shermani 7,18%; Tarassovi 2,76%; Sentot 2,76%; Autumnalis 1,66%; Bratislava 1,10%	HASHIMOTO et al. (2012)
RS	Adultos criados extensivamente	527/1.360	38,8%	Hardjo 29,12%; Hebdomadis 2,21%; Wolffi 1,54%; Grippotyphosa 1,18%; Pomona 1,10%; Bratislava 0,88%	HERRMANN et al. (2012)
SC	Fêmeas com problemas reprodutivos	229/723	31,7%	Não informado	PASQUALOTTO et al. (2015)

Tabela 6. Relação de fatores de risco para infecção por *Leptospira* spp. em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 2003 e 2014.

Autores	Fatores de risco
LILENBAUM; SOUZA (2003)	Ausência de assistência veterinária, contato com outros animais (principalmente suínos)
CASTRO et al. (2009)	Tamanho do rebanho (>24 animais), presença de suínos, uso de inseminação artificial, compra de reprodutores de outras fazendas, pastos compartilhados, criação de ovinos/caprinos
FIGUEIREDO et al. (2009)	Raça (zebu) e tipo de exploração (corte)
MARQUES et al. (2010)	Tipo de exploração (corte); prática de inseminação artificial; raça europeia de corte; presença de ovinos e caprinos; presença de capivaras; compra de reprodutores em exposições e de outras propriedades; aluguel de pastos em alguma época do ano; presença de piquete maternidade e ocorrência de abortos
OLIVEIRA et al. (2010)	Presença de mais de 28 fêmeas bovinas em idade reprodutiva no rebanho, presença de cervídeos, compra de animais, abate de animais na própria fazenda, utilização de pastos compartilhados e presença de suínos
SCHOONMAN; SWAI (2010)	Sistema de pastagem, presença de cabras/ovelhas na propriedade, idade e tipo de piso do galpão
CARVAJAL-DE LA FUENTE et al. (2012)	Raça, presença de animais domésticos e selvagens que consumiam placenta e fetos abortados.
HASHIMOTO et al. (2012)	Número de animais ≥43, compra de animais para reposição, aluguem de pastos, a presença de piquetes maternidade e a presença de cavalos na propriedade
RYAN et al. (2012)	Número de reprodutores, tamanho do rebanho, uso de monta natural, tamanho da pastagem e porcentagem de áreas de pastagem alagada na propriedade
SILVA et al. (2012)	Presença de equinos, presença de capivaras e rebanhos bovinos com 32 ou mais fêmeas adultas
PIMENTA et al. (2014)	Presença de animais silvestres e a presença de pastos alagados
SALGADO et al. (2014)	Monta natural, uso de piquete maternidade

A presença de outros animais na propriedade, compra de animais e tamanho do rebanho foram os fatores mais vezes identificados. Animais de diferentes espécies podem servir de hospedeiros de manutenção de diferentes sorovares de *Leptospira*, e o convívio estreito com os bovinos propicia a disseminação da leptospirose, influenciando o status de infecção dos rebanhos leiteiros (SALGADO et al., 2014). Em rebanhos maiores, o número de animais expostos ao agente também é maior,

aumentando a probabilidade de disseminação da doença e tornando-se mais difícil seu controle e erradicação. Além disso, as variáveis tamanho do rebanho e compra de animais, frequentemente encontram-se associadas. Quando isso ocorre sem a realização de controle sanitário, pode levar a introdução, manutenção e disseminação da leptospirose na propriedade (OLIVEIRA et al., 2010).

2.3.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Após a fase de bacteremia que pode durar até 7 dias, começam a aparecer os sinais clínicos relacionados às lesões no endotélio de pequenos vasos sanguíneos (LEVETT, 2001). Componentes de *Leptospira* ou toxinas podem induzir diretamente lesão tecidual, no entanto, a persistência da infecção gera respostas inflamatórias do hospedeiro, e a consequente liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, que promovem danos adicionais resultando em lesões severas aos órgãos afetados e manifestações clínicas mais graves (CHIRATHAWORN; KONGPAN, 2013). Essas lesões levam à isquemia localizada do órgão afetado resultando em necrose tubular renal, lesão hepatocelular e pulmonar, meningite, miosite e placentite. Hemorragias e icterícia podem ocorrer nos casos graves, geralmente acompanhadas de granulocitose e esplenomegalia (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A icterícia ocorre devido à extensa lesão hepática, confirmada pelo aumento das transaminases hepáticas, gama glutamil transferase e fosfatase alcalina. A colestase ocasionada pela presença de leptospiras nos canalículos biliares, provoca um aumento na bilirrubina sérica e também contribui para o agravo da icterícia (PEREIRA et al., 2005). Os túbulos renais são o local de preferência para a colonização pelas leptospiras. Tantos nos túbulos renais quanto na bexiga, embora haja certa presença de anticorpos, eles são incapazes de neutralizar a bactéria, provavelmente devido ao baixo aporte sanguíneo nestes locais (ATHANAZIO et al., 2008).

A maioria das infecções causadas por leptospiras são assintomáticas, e sinais reprodutivos são a principal evidência de infecção. No entanto, a leptospirose pode desenvolver sinais clínicos graves dependendo da competência imunológica do hospedeiro, do sorovar envolvido na infecção e da localização do patógeno (JAFARI DEHKORDI; SHAHBAZKIA; RONAGH, 2011). Na fase aguda as principais manifestações clínicas são febre, anemia hemolítica com hemoglobinúria, icterícia e

petéquias nas mucosas, alterações no leite como queda na produção, leite avermelhado com presença de coágulos e mastite (RADOSTITS, OTTO M.; GAY, CLIVE C.; BLOOD, DOUGLAS C.; HINCHCLIFF, 2000). Na forma crônica ocorrem infertilidade, aborto, natimortos e a queda na produção de leite, além de gerar perdas econômicas relacionadas a custos com assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais (TONIN et al., 2010). As formas mais graves ocorrem com mais frequência em bezerros e cursa com febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão e angústia pulmonar, insuficiência renal e hepática, e ocasionalmente meningite e morte (FAINE et al., 1999).

2.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose depende muito do exame clínico do animal, sendo importante investigar casos de queda brusca da produção de leite, principalmente se acompanhada de algum outro sinal como icterícia ou hemoglobinúria, ou ainda em casos de infertilidade crônica com ocorrência de abortos e reabsorções fetais. As provas laboratoriais envolvem testes que se dividem entre a possibilidade de detecção de anticorpos anti-*Leptospira* e da constatação da presença de antígenos ou DNA bacteriano nos tecidos animais. A escolha de cada um dependerá da fase evolutiva em que se encontra o paciente e da finalidade do ensaio (OIE, 2016b). Cada um deles apresenta certas peculiaridades, que são fundamentais para o sucesso na detecção, seja do agente ou de anticorpos.

A bacteremia transitória, que ocorre principalmente na primeira semana de infecção, nem sempre é acompanhada de sinais clínicos, tornando difícil sua detecção através de amostras de sangue e limitando o isolamento e identificação das leptospiras em animais *in vivo* (PICARDEAU, 2013). Do mesmo modo, a demonstração de leptospiras no trato genital ou urinário pode apenas indicar que o animal seja portador. Por isso em ambos os casos é fundamental a observação da coexistência de sinais clínicos de doença aguda. No entanto, quando há possibilidade de coleta de material durante a fase de bacteremia, ou seja, durante o período inicial da infecção, testes de detecção de antígeno são os teste de escolha para a identificação das leptospiras, visto que durante esta fase ainda não são detectados anticorpos no sangue (SMITH et al., 1994).

Os anticorpos anti-*Leptospira* aparecem aproximadamente uma semana após o início da doença e persistem por vários meses. Com isso, os testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos tem sido os procedimentos de escolha para o diagnóstico laboratorial da leptospirose (LEVETT, 2001). O MAT é o teste sorológico padrão e o meio de diagnóstico mais utilizado, tanto para testar animais de maneira individual quanto em rebanhos, sendo o método recomendado pela OIE em estudos de prevalência da infecção. O teste possui como vantagem a diferenciação do sorovar presente na infecção, mas para tanto, os antígenos selecionados para utilização no MAT deverão incluir estirpes representativas dos sorogrupos conhecidos por existir na região, bem como aqueles conhecidos por serem característicos da espécie em teste (OIE, 2016b). Contudo, em animais cronicamente infectados os títulos de anticorpos podem cair para níveis indetectáveis, mesmo que haja manifestação de sinais clínicos, dificultando sua detecção nesse tipo de teste (LEVETT, 2001). Outro ponto desfavorável é a impossibilidade de diferenciação entre o tipos e a origem das imunoglobulinas, e a consequente distinção entre a origem da titulação de anticorpos ser de infecção natural ou devido à vacinação (SMITH et al., 1994).

2.4 Neosporose

2.4.1 Agente etiológico e ciclo biológico

A neosporose é causada pelo protozoário coccídio *Neospora caninum*, um parasita intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, subordem Eiomeriose, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (DUBEY et al., 1988). É um parasito formador de cistos que acomete diversas espécies de animais, sendo responsável por grande parte dos abortos de origem infecciosa em bovinos ao redor do mundo (REICHEL et al., 2013). Possui grande semelhança com *Toxoplasma gondii*, no entanto apresenta características antigênicas, imunogênicas e patogênicas distintas em relação aos seus hospedeiros (DUBEY et al., 1988).

O ciclo de vida do *N. caninum* é heteróxeno e apresenta três formas típicas segundo sua fase de multiplicação: taquizoítos, bradizoítos contidos em cistos e esporozoítos no interior dos oocistos (DUBEY, 2003). Os HDs podem se infectar através da ingestão de cistos presentes nos tecidos dos HIs, de oocistos esporulados

ou verticalmente por taquizoítos através da placenta. Os cistos contendo bradizoítos (Fig.5) possuem forma esférica e são encontrados principalmente no sistema nervoso central e esporadicamente no sistema nervoso periférico, na musculatura e na retina (DAFT et al., 1997; DUBEY; LINDSAY, 1996; PETERS et al., 2001).

Durante o processo de digestão, acontece a dissociação da parede do cisto e a liberação dos bradizoítos, que penetram nos enterócitos, onde ocorre a diferenciação sexual em esporozoíto e formação de oocistos. Os HDs eliminam oocistos não esporulados através das fezes contaminando os pastos e a água. Essa eliminação tem início a partir do quinto dia após a ingestão das formas teciduais e se mantendo por um período de aproximadamente três semanas. A quantidade de oocistos liberados nas fezes pode variar de acordo com o tecido de infecção, o número de cistos ingeridos, bem como com a idade do cão (GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2005).

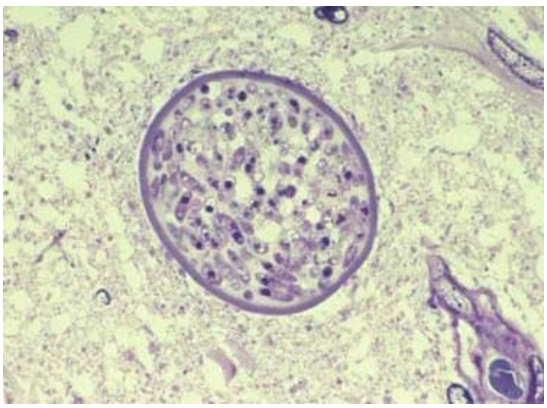


Figura 5. Cisto tecidual contendo bradizoítos de *N. caninum*.
Fonte: https://ruthdavies.files.wordpres.com/2014/02/neospora-caninum_-cyst-ii.jpg

Os oocistos têm formato arredondado ou ovalado, possuem parede grossa e contém em seu interior dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos, que apresentam formato alongado (Fig.6) (LINDSAY; UPTON; DUBEY, 1999). Em contato com o ambiente os oocistos esporulam após 24 a 72 horas, dependendo das condições de umidade e temperatura, tornando-se altamente resistentes às adversidades do meio, como altas temperaturas, dessecação e ação de desinfetantes (BELLI; SMITH; FERGUSON, 2006).

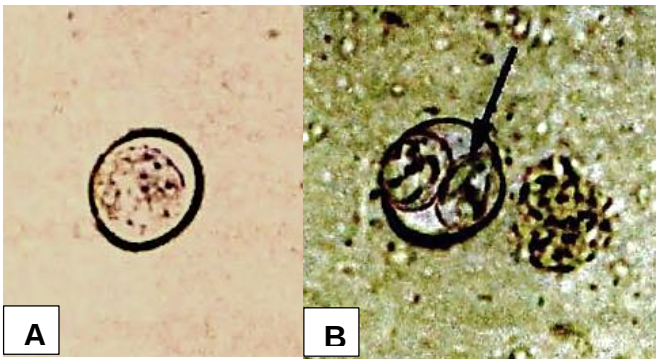


Figura 6. Oocistos de *N. caninum* contendo esporozoítos não esporulados (A) e esporulados (B), em seu interior. Fonte: (ANDREOTTI et al., 2003)

Os HIs ingerem oocistos esporulados através de água, alimentos contaminados, ou mesmo pelo contato direto com as fezes. Quando chegam no intestino a parede dos oocistos é digerida, liberando os esporozoítos que penetram na parede intestinal, diferenciam-se em taquizoítos e passam por uma fase de multiplicação, possivelmente nos linfonodos mesentéricos. A partir daí, os taquizoítos são liberados no sangue (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006)**.** Eles se dividem rapidamente dentro das células e podem infectar muitos tipos de células, incluindo células neurais, células endoteliais vasculares, miócitos, hepatócitos, células renais, macrófagos alveolares e trofoblastos placentários. Os taquizoítos se dividem por endodiogenia, processo no qual duas células-filhas são formadas dentro da célula-mãe. Como consequência dessa multiplicação, ocorre a lise celular e a liberação dos taquizoítos, que passam a infectar outras células. (DUBEY et al., 2002).

Os taquizoítos tem formato semilunar (Fig.7) e são dotados de diversas organelas localizadas no complexo apical. Essas organelas são responsáveis pela secreção de enzimas e proteínas, que auxiliam na fixação e adesão à superfície celular. Após penetrarem na célula hospedeira, encontram-se dentro de vacúolos parasitóforos localizados no citoplasma. São encontrados em diversos tipos celulares como neurônios, células musculares, principalmente do coração, células endoteliais e outros órgãos como fígado, rins e placenta (DUBEY, 1999).

Os taquizoítos e cistos teciduais são os estágios intracelulares do parasita, encontrados nos HIs (DUBEY, 1999). A diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos e a consequente formação de cistos teciduais se dá, provavelmente, como forma de evasão à resposta imune do hospedeiro. Do mesmo modo, em situações onde há uma diminuição na imunidade do hospedeiro, os bradizoítos rompem os cistos teciduais,

se diferenciam em taquizoítos e reiniciam o processo de invasão celular e reprodução assexuada. O verdadeiro mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que se dê à semelhança do que ocorre com *T. gondii*, cuja interação com o hospedeiro é coordenada de maneira extremamente delicada, envolvendo diversas células do sistema imune, receptores "*Toll-like"* e um complexo mecanismo de ativação das vias de sinalização e produção de citocinas (MILLER et al., 2009).

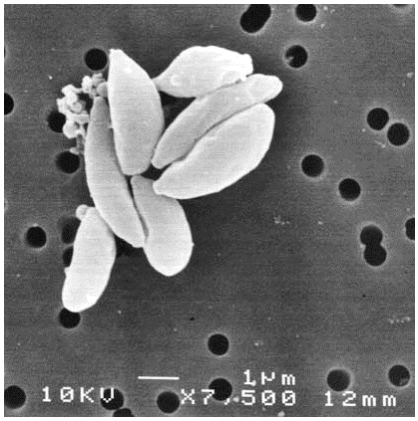


Figura 7. Taquizoítos de *N. caninum*.
Fonte: http://www.gds18.org/
Neosporose/images_NEO/neo1.jpg

2.4.2 Epidemiologia

Os HDs são principalmente os cães (*Canis lupus familiaris)*, no entanto já foi descrita presença de oocistos nas fezes de coiotes (*Canis latrans*), dingos australianos (*Canis lupus dingo*) e lobos (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011; GONDIM et al., 2004a; KING et al., 2010; MCALLISTER et al., 1998). Estes hospedeiros podem no entanto atuar tanto como HD quanto HI, abrigando também os estágios teciduais do parasita (DUBEY et al., 2014). Várias espécies de animais domésticos e silvestres, inclusive o homem, podem ser infectadas pelo parasito e servir como HI (GONDIM et al., 2004b; LOBATO et al., 2006). Há confirmação de infecção natural em bovinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos, galinhas, pássaros, búfalos, felinos selvagens, alpacas, antílopes, bisões, camelos, camundongos, capivaras, cervos, guaxinins, javalis, lagomorfos, lhamas, mamíferos marinhos, rinocerontes, roedores, urubus e veados (AZEVEDO et al., 2010; BARTLEY et al., 2013; DARWICH et al., 2012; DUBEY et al., 2003; DUBEY, 1999; DUBEY; SCHARES, 2011; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; GONDIM et al., 2010).

A transmissão do *N. caninum* ocorre por dois mecanismos: horizontal e vertical. Na transmissão horizontal, ou pós-natal, os hospedeiros susceptíveis se contaminam através da ingestão de oocistos esporulados ou de tecidos com cistos contendo bradizoítos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Na transmissão vertical, ou congênita, a doença é transmitida da mãe para seus descendentes através da placenta, sendo dividida em dois tipos: exógena quando a mãe se infecta durante a gestação e a parasitemia resulta na disseminação do parasito pelo útero gravídico, contaminando o feto; e a endógena quando a fêmea, infectada antes da prenhez, sofre uma reativação da infecção desencadeada pela diminuição de sua imunidade durante a gestação, transmitindo-a ao feto (TREES; WILLIAMS, 2005) . Essa fêmea pode ter sido contaminada também de dois modos: após o nascimento mas antes da gestação, ou de maneira congênita e por isso ser persistentemente infectada. A via endógena é considerada o modo mais comum de infecção em bovinos, contribuindo para a manutenção da infecção em rebanhos mesmo sem a participação de HD, pela transmissão do parasito de um animal para outro de geração em geração (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Porém, foi constatada uma diminuição na taxa de infecção congênita com a idade do animal, sugerindo que as vacas desenvolvem um grau de imunidade que impeça a transmissão transplacentária endógena com o passar do tempo (DIJKSTRA et al., 2003).

Através da análise de diversos estudos de prevalência realizados na região sul do país (Tab.7), observa-se pouca variação entre os estados com médias de 22,75% no RS, 21,87% no PR e 32,8% em SC. Contudo a diferença é bem mais acentuada quando os estudos são avaliados individualmente, variando de 11,2% a 53,3% só no estado do RS (CAMILLO et al., 2011; CORBELLINI et al., 2002). Estima-se que muitos dos casos de aborto causado pelo parasito ainda não sejam diagnosticados. Isso ocorre além de outros motivos, pela falta de interesse de alguns proprietários e pela não inclusão da doença na rotina de diagnósticos laboratoriais (ANDREOTTI et al., 2003).

Assim como as demais enfermidades, diversos fatores podem favorecer a ocorrência da infecção, e foram amplamente avaliados segundo a literatura. No entanto apesar de diversas tentativas de identificar esses fatores, existe grande diversidade entre os resultados avaliados (Tab.8).

Tabela 7. Estudos sorológicos sobre a prevalência de anticorpos anti-N. *caninum* em bovinos da região sul do Brasil (2001-2013)

UF	Características da amostra	n	Pos.	Prev.	Referência
PR	Rebanho com histórico de aborto	172	60	34,8%	LOCATELLI-DITTRICH et al. (2001)
RS	Fêmeas leiteiras	223	25	11,2%	CORBELLINI et al. (2002)
RS	Fêmeas de corte e leite	140	28	20,0%	RAGOZO et al. (2003)
PR	Fêmeas de corte e leite	90	20	22,2%	RAGOZO et al. (2003)
PR	Fêmeas leiteiras	623	89	14,3%	GUIMARÃES et al. (2004)
PR	Fêmeas leiteiras	385	45	12%	OGAWA et al. (2005)
PR	Fêmeas com histórico de aborto	35	5	14,3%	SANTOS et al. (2005)
RS	Fêmeas Leiteiras	1.549	276	17,8%	CORBELLINI et al. (2006)
RS	Machos e fêmeas	781	89	11,4	VOGEL et al. (2006)
PR	Não informado	1.263	423	33%	LOCATELLI-DITTRICH et al. (2008)
RS	Vacas lactantes	201	107	53,3%	CAMILLO et al. (2011)
PR	Fêmeas Leiteiras	309	63	20,4%	MARTINS; VIEIRA (2012)
SC	Fêmeas leiteiras	373	86	23,1%	MOURA et al. (2012)
PR	Fêmeas leiteira	94	23	24%	LANGONI et al. (2013)
SC	Fêmeas de corte	120	51	42,5%	MACEDO et al. (2013)

*n: número de amostras testadas; Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência

A presença de cães na propriedade é um exemplo claro disso. Sabe-se que os cães são os principais reservatórios do parasito, levando a crer que a presença destes nas propriedades fosse diretamente proporcional ao número de animais positivos. Todavia, apesar de ter sido descrito como fator de risco por alguns autores, esta não é uma realidade absoluta. Isso acontece possivelmente devido às diferentes pressões de infecção à que os rebanhos de diferentes regiões estão submetidos, além dos diferentes hábitos alimentares dos cães presentes nas propriedades e de outros hospedeiros silvestres encontrados em cada região (BARLING et al., 2000; MARTINS; VIEIRA, 2012). Em suma, estas variáveis estão associadas principalmente às condições que afetem a imunidade dos bovinos, ou que facilitem o contato mais íntimo entre os eles e os HDs da doença

Tabela 8. Relação de fatores de risco para infecção por *N. caninum* em bovinos, por autor, obtidos através de estudos realizados entre os anos de 1999 e 2015.

Autores	Fatores de risco
(BARTELS; WOUDA; SCHUKKEN, 1999)	Presença de cães, presença de aves e alimentação com silagem de milho mofada
(BARLING et al., 2000)	Densidade, abundancia de hospedeiros definitivos
(GUIMARÃES et al., 2004)	Idade (>24m), raça (Holandesa)
(SARTOR et al., 2005)	Tipo de exploração (leite)
(CORBELLINI et al., 2006)	Número de cães na propriedade, área da fazenda (menores), utilização de pool de colostro, região
(GUIMARÃES JÚNIOR; ROMANELLI, 2006)	Período de nascimento dos bezerros, densidade animal, manutenção de animais em uma única área, permitindo parições e concentração de bovinos nesses locais, canídeos selvagens com acesso à ração, novilhas criadas para reposição na propriedade
(OSHIRO et al., 2007)	Histórico de aborto
(SILVA et al., 2008)	Falta assistência veterinária, estado nutricional, presença de instalações alagadiças, falta de proteção no manuseio do feto, manutenção e tratamento das vacas que abortaram, histórico de aborto e fase da gestação em que ocorre
(BRUHN, 2012)	A ocorrência de repetição de cio, abortos repetidos, anestro temporário, os cães criados soltos e/ou alimentados com carne crua
(MARTINS; VIEIRA, 2012)	Produção de alimentos na fazenda, a ausência de programa de inseminação artificial e o acesso de animais domésticos e selvagens às instalações das vacas leiteiras ou ao alimento das vacas
(SOUSA et al., 2012)	Criação de bovinos sem outras espécies consorciadas, destino inadequado dos fetos abortados
(LLANO, 2015)	Histórico de aborto, compra de animais para reposição, idade (>36m), ordenha manual

.

2.4.3 Patogenia e sinais clínicos

Os bovinos são altamente suscetíveis à infecção por *N. caninum*, causando grandes prejuízos devido à ocorrência de abortos, natimortos e nascimento de animais cronicamente infectados. (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). O aborto ocorre por diversos fatores. A multiplicação dos taquizoítos gera inflamação, necrose e descamação do endotélio vascular da placenta, dando início à formação de trombos que interrompem o fluxo sanguíneo. Isso pode causar danos diretos à placenta ocasionando a morte fetal por falta de oxigenação. Além disso, as lesões causadas pelo parasita podem causar a liberação de prostaglandinas maternas, que por sua vez

causam luteólise e aborto. Ou ainda a produção de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, como o IFN-y, TNF e interleucina 12 na placenta, que induzem à uma resposta imune e consequente expulsão do feto. Danos primários no feto também ocorrem, com presença de pontos de necrose tecidual principalmente no miocárdio e sistema nervoso (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; INNES et al., 2002).

Todas as fêmeas podem abortar, mas a gravidade desta manifestação clínica é influenciada pela idade, fase gestacional e intensidade da resposta imune do hospedeiro. A infecção transplacentária durante o primeiro trimestre de gestação é geralmente mais grave e ocasiona o aborto, estando provavelmente associado à imaturidade do sistema imune do feto, que é incapaz de combater com eficácia a infecção. Por outro lado, infecções mais tardias tendem a ser mais brandas. Os fetos que se contaminam e sobrevivem à infecção, podem nascer clinicamente normais, no entanto permanecem infectados durante toda a vida (RAMOS et al., 2016). A infecção fetal pode causar além do aborto, reabsorção embrionária, autólise e mumificação fetal. Apesar de ocorrer em todas as fases gestacionais, é descrita uma frequência maior de abortos entre o 5º e 6º mês de gestação (DUBEY; SCHARES, 2011). A expulsão de fetos mumificados por sua vez, é um indicativo de que a infecção foi instalada antes do quinto mês de gestação (BARR; ANDERSON; SVERLOW, 1995) Outros sinais clínicos, além das desordens reprodutivas, só foram relatados em animais com menos de dois meses de idade e incluem flexão de membros anteriores ou posteriores, ataxia, diminuição do reflexo patelar, perda de consciência proprioceptiva, exoftalmia e eventualmente defeitos congênitos do sistema nervoso (DUBEY; SCHARES, 2011).

2.4.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da neosporose é difícil devido à inespecificidade dos sinais clínicos, sendo necessária confirmação através de análise laboratorial dos casos suspeitos. Entretanto, mesmo nos casos em que há confirmação laboratorial através de sorologia ou da detecção do parasita, é difícil estabelecer uma relação entre o aborto e o parasita, visto que infecções assintomáticas são comuns e, encontrar a presença do parasita, não significa que ele causou o aborto (DUBEY; SCHARES, 2011).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para detecção de infecção por *N. caninum* como, histopatologia, imunohistoquímica, técnicas moleculares, isolamento e cultivo, ou ainda técnicas sorológicas como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA, aglutinação direta e imunoblotting (DUBEY; SCHARES, 2011). As provas sorológicas são as mais utilizadas para o diagnóstico em animais vivos, destacando-se entre elas a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste de ELISA. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o teste sorológico de referência para o diagnóstico em infecções por *N. caninum* (DUBEY; SCHARES, 2006). A técnica visa a detecção de anticorpos contra os antígenos de superfície dos taquizoítos. Para isto, diversas diluições do soro suspeito são distribuídas em lâminas contendo taquizoítos fixados, seguida pela aplicação de anti-IgG bovina conjugada com fluoresceína. Resultados positivos são obtidos pela visualização de fluorescência na amostra. Ao início das análises um ponto de corte deve ser estabelecido em relação à diluição do soro que será considerada positiva (ANDREOTTI et al., 2003).

O ELISA é o método de eleição para avaliação de rebanhos pois além da rapidez na execução da técnica, apresenta alta sensibilidade e especificidade, e leitura objetiva dos resultados diminuindo a possibilidade de interpretações errôneas (ANDREOTTI et al., 2003). Podem ser utilizados antígenos originados de lisados do parasita, no entanto a utilização de proteínas de superfície recombinantes, possibilita maior sensibilidade e especificidade (BORSUK et al., 2011). Aguado-Martínez et al. (2008) descreveram ainda a utilização de ELISAs baseados nas proteínas recombinantes NcGRA7 e NcSAG4 para detecção e diferenciação entre infecção primária, reativação e infeção crônica. Contudo, a janela para o diagnóstico de uma infecção aguda é curta, durando apenas uma semana após a infecção (DUBEY; SCHARES, 2011).

O diagnóstico através do feto é realizado por exame histopatológico ou imunohistoquímico do cérebro, uma vez que a lesão mais característica da doença é encefalite focal com presença de necrose não supurativa. Porém, vários outros órgãos podem ser utilizados na tentativa de detectar a presença do parasito como: coração, fígado, pulmão, rim e músculos esquelético (PESCADOR et al., 2007).

3 Artigo

Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp e *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS

Róber Zardo, Tatiane Senna Bialves, Matheus Costa Da Rosa, Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, Renato Andreotti, Fábio Pereira Leivas Leite, Odir Antônio Dellagostin

Submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS

Prevalence and variables associated with BoHV-1, BVDV, Leptospira *spp. and* Neospora caninum *infection in dairy cattle, in Novo Xingu county, Rio Grande do Sul state*

R. Zardo[1], T.S. Bialves[1], M.C. Da Rosa[1], P.R.C. Rodrigues[1], R. Andreotti[2], F.P.L. Leite[1], O.A. Dellagostin[1]

[1]Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS
[2]Embrapa Gado de Corte – Campo Grande, MS

RESUMO

As doenças reprodutivas infecciosas geram grandes prejuízos à exploração pecuária devido à ocorrência de abortos, perdas embrionárias e queda na produção. Assim, este estudo teve como objetivo investigar a soroprevalência de anticorpos contra BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* no rebanho leiteiro do município de Novo Xingu. Foram coletadas 405 amostras de soro de fêmeas bovinas provenientes de 109 rebanhos e determinadas as variáveis associadas à infecção por cada agente. As amostras foram divididas em categorias de acordo com o *status* vacinal do rebanho. Dentre os 147 animais vacinados, 74,8% possuíam títulos de anticorpos contra BoHV-1, 53% contra BVDV e 52,3% contra *Leptospira* spp. A vacinação não conferiu imunidade protetora em mais de 40% dos bovinos. Entre os 258 animais não vacinados, 9,3% foram positivos pra BoHV-1, 11,2% para BVDV, 12% para *Leptospira* spp. e 37,3% para *N. caninum*. Tiveram associação à soropositividade dos animais as variáveis: histórico de aborto, mães ou avós com histórico de aborto, histórico de retorno ao cio, utilização de piquete maternidade e presença de animais silvestres. Os resultados demonstraram eficácia limitada conferida pelas vacinas comerciais, baixa prevalência das doenças víricas e bacteriana avaliadas e significativa presença de *N. caninum* nos rebanhos.

Palavras-chave: doenças reprodutivas, soroepidemiologia, vacinas, fatores de risco

ABSTRACT

Infectious reproductive diseases cause great economic losses to livestock production due to the occurrence of abortions, embryonic losses and production decrease. Thus, this study aimed to investigate the seroprevalence of antibodies against BoHV-1, BVDV, Leptospira *spp. and* Neospora caninum *in the dairy herd of the municipality of Novo Xingu. A total of 405 serum samples of dairy cattle from 109 herds were collected and the variables associated with infection by each agent were determined. Samples were divided into two categories according to the herd's vaccine status. Among the 147 vaccinated animals, 74.8% had antibody titers against BoHV-1, 53% against BVDV and 52.3% against* Leptospira *spp. Vaccination did not confer protective immunity in more than 40% of bovines. Among the 258 unvaccinated animals, 9.3% were positive for BoHV-1, 11.2% for BVDV, 12% for* Leptospira *spp. and 37.3% for* N. caninum. *The following variables were associated with the seropositivity of the animals: history of abortion, mothers or grandparents with a history of abortion, history of return to estrus, use of a maternity picket and presence of wild animals. The results demonstrated limited efficacy conferred by commercial vaccines, low prevalence of viral and bacterial diseases and the significant presence of neosporosis in herds.*

Key words: reproductive diseases, seroepidemiology, vaccines, risk factors

INTRODUÇÃO

As manifestações clínicas de ordem reprodutiva observadas nos bovinos envolvem morte embrionária ou fetal, repetições de cio, abortos, mumificação fetal e natimortos. Esses distúrbios estão relacionados a uma série de fatores como problemas de manejo, sanitários, nutricionais e ambientais. Contudo, grande parte dos casos de aborto ou natimortos em bovinos são causados por agentes infecciosos, destacando-se entre estes o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), o herpesvírus bovino tipo I (BoHV-I), o *Neospora caninum* e a *Leptospira* spp. (Givens, 2006).

A diarreia viral bovina (BVD) é uma enfermidade causada pelo BVDV que promove doença respiratória, doença gastroentérica (BVD e Doença das mucosas), distúrbios reprodutivos e diminuição da resposta imune do hospedeiro, favorecendo o aparecimento de infecções secundárias. Infecções transplacentárias ocorridas pelo biótipo não citopático do vírus, entre o 40º e 120º dia de gestação, ocasionam o nascimento de bezerros persistentemente infectados. Estes são fontes constantes e permanentes de eliminação do vírus, e por isso principais disseminadores da infecção nos rebanhos (Flores *et al.*, 2005).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) por sua vez, é responsável por um complexo de enfermidades que acometem o trato respiratório e reprodutor dos bovinos, determinadas de acordo com a localização dos sinais clínicos e o genótipo do vírus (Flores, 2007). Assim como os demais integrantes da sua família, o BoHV-1 tem sua estimativa de prevalência dificultada devido à capacidade de estabelecer latência nos gânglios nervosos, gerando níveis muitas vezes indetectáveis de anticorpos circulantes (Holz *et al.*, 2009). Esta característica possibilita sua manutenção no rebanho, com esporádica reativação em condições de diminuição da resposta imune do hospedeiro. Tal condição pode ou não ser acompanhada de sinais clínicos, tornando os animais portadores disseminadores silenciosos da doença (Jones, 2003).

A neosporose, doença causada pelo protozoário *Neospor*a *caninum*, é considerada uma das causas infecciosas mais importantes de abortos em bovinos em todo o mundo, responsável por perdas econômicas globais em torno de US$ 2 bilhões/ano (Reichel *et al.*, 2013). Estima-se que só no Brasil, mais de 474 mil abortos podem estar ocorrendo devido à doença em rebanhos leiteiros (Nicolino *et al.*, 2015). O protozoário tem no cão seu principal hospedeiro definitivo e várias espécies de animais domésticos como hospedeiros intermediários. Pode ser transmitido de maneira horizontal através da ingestão de oocistos contendo esporozoítos esporulados ou verticalmente via transplacentária (Andreotti *et al.*, 2010).

Já a leptospirose é uma antropozoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* que acomete o homem e uma ampla gama de animais domésticos e selvagens (Oliveira *et al.*, 2013). Os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo, no entanto podem ser infectados por uma série de sorovares comuns às outras espécies. Os animais infectados eliminam a bactéria

principalmente através da urina, mas também nas secreções uterinas e líquidos fetais, contaminando a água, o solo e a vegetação (Oliveira *et al.*, 2013). As leptospiras penetram no hospedeiro principalmente através das mucosas e de lesões na pele, contudo pode haver transmissão por meio do sêmen contaminado (Lilenbaum *et al.*, 2008). Na forma aguda, a doença manifesta-se por febre, anemia hemolítica com hemoglobinúria, icterícia, petéquias nas mucosas e alterações como queda na produção de leite, leite avermelhado e mastite (Radostits *et al.*, 2000).

Esses agentes encontram-se amplamente disseminados por todo o estado do Rio Grande do Sul, com prevalências médias próximas à 53,5% (BVDV), 27% (BoHV-1), 38,75% (*Leptospira* spp.) e 18% (*N. caninum*) (Becker *et al.*, 2015; Corbellini *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2012; Holz *et al.*, 2009). No entanto, poucos estudos foram realizados na região onde o município está situado e uma estimativa mais atualizada da prevalência dessas doenças se fez necessária, uma vez há uma ampla casuística de problemas reprodutivos naquela localidade. Por isso o objetivo deste estudo foi, através de exames sorológicos e da aplicação de um questionário epidemiológico, estimar a prevalência e os aspectos relevantes associados à infecção por BVDV, BoHV-1, *Leptospira* spp e *Neospora caninum* no rebanho bovino leiteiro do município de Novo Xingu, localizado na mesorregião noroeste do RS, maior produtora de leite do país (IBGE, 2015). Essas informações servirão de base para o estabelecimento de um programa de prevenção e controle destas enfermidades junto aos produtores locais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em propriedades leiteiras localizadas no município de Novo Xingu (27°44'49"S, 53°03'18"O), situado na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Foram considerados apenas estabelecimentos que possuíssem pelo menos cinco fêmeas bovinas em idade reprodutiva no rebanho. A amostragem foi do tipo aleatória simples, considerando um nível de confiança de 95%, erro amostral de 5% e uma frequência esperada (FE) de 50% para uma população de 2400 animais, distribuídos em 152 propriedades. A utilização de uma FE de 50% deu-se devido à falta de dados reais a respeito de levantamento deste tipo no município. A partir do cálculo estabeleceu-se a coleta estratificada de 20% das fêmeas em idade reprodutiva, de cada uma das

propriedades visitadas. Com isso, foram coletadas 405 amostras provenientes de 109 propriedades, representando 16,9% do rebanho e 72% das propriedades leiteiras do município.

Concomitante à coleta foi aplicado um questionário epidemiológico envolvendo variáveis possivelmente associadas à sorologia positiva do rebanho. Dentre elas: tamanho da propriedade, número de animais no rebanho, tipo de criação, utilização de inseminação artificial ou monta natural, aluguel de pasto, utilização de piquete maternidade, presença de fungos na silagem, uso de adsorvente de micotoxinas, utilização de silo para ração, presença de áreas alagadas na propriedade, presença de animais silvestres, local fixo de alimentação, repasse de pastagem por categorias mais jovens, se as novilhas comem restos de alimentação das vacas, ocorrência de retorno ao cio, ocorrência de abortos, fase da gestação em que ocorreram, relação de parentesco entre fêmeas que abortaram, uso de vacinação e fomento reprodutivo por Médico Veterinário.

As coletas foram realizadas entre os meses de janeiro a abril de 2016, conforme aprovação junto à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UFPEL) sob o número 7027/2015. O sangue foi coletado por punção da veia coccígea, utilizando-se sistema fechado de coleta (Vacutainer®). Após obtenção do soro foi feita a inativação do sistema complemento, em banho-maria a 56 ºC por 30 min, e as amostras foram armazenadas a -20 ºC até a realização dos ensaios.

A sorologia para diagnóstico de IBR e BVD foi realizada no Laboratório de Virologia da UFPEL através de soroneutralização (SN), conforme técnica descrita por FISCHER *et al.* (2007). Para isso foram utilizadas as estirpes virais BoHV-1 LA e BVDV NADL e células MDBK (“Madin Darby Bovine Kidney”).

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* as amostras foram processadas por duas técnicas distintas, em razão da utilização futura destes dados como comparativo em relação à um teste diagnóstico ainda em desenvolvimento. Deste modo, 200 amostras foram analisadas no Laboratório de Biologia Molecular e Sanidade animal da Embrapa Gado de Corte, pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) conforme descrito por Andreotti *et al.* (2010). Foram consideradas positivas as amostras em que foi observada fluorescência da superfície dos taquizoítos na diluição de 1:100. As 205 amostras restantes foram analisadas por ELISA comercial (Neospora X2 Ab Test - IDEXX©).

O diagnóstico de leptospirose foi realizado por meio do Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) segundo critérios recomendados pelo "Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control" (WHO, 2003). Um pré-ensaio foi realizado em 10% das amostras, utilizando-se 21 sorovares. A partir deste, foram selecionados os 13 sorovares com maior taxa de aglutinação para a análise das demais amostras (Tab. 1). Considerando-se como positivas as amostras que tiveram aglutinação ≥50% das leptospiras na diluição de 1:100, em comparação ao controle. A seguir foi feita a titulação das amostras positivas em diluições crescentes na proporção geométrica de razão dois, de 1:100 à 1:3200.

Tabela 1. Relação de sorovares de *Leptospira* utilizados na realização do MAT.

Espécie	**Sorogrupo**	**Sorovar**	**Cepa**
L. interrogans	*Autumnalis*	Autumnalis	AKIYAMI A
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
	Canicola	Canicola	HOND UTRECHT IV
	Hebdomadis	Hebdomadis	HEBDOMADIS
	Sejroe	Hardjo	HARDJOPRAJITNO
	Djasiman	Djasiman	DJASIMAN
L. kirshneri	*Grippotyphosa*	Grippotyphosa	MOSKVA V
L. borgpetersenii	*Ballum*	Castellonis	CASTELLON 3
	Sejroe	Hardjo	HARDJOBOVIS
	Javanica	Javanica	VELDRATBATAVIA 46
	Tarassovi	Tarassovi	PRELEPELITSIN
L. noguchii	*Panama*	Panama	CZ 214K
L. santarosai	*Shermani*	Shermani	1342 K

O cálculo da amostragem e a compilação dos dados do questionário, bem como a análise estatística, para obtenção dos valores de prevalência e associação entre as variáveis (regressão logística) foram realizados utilizando-se o programa EpiInfo™ versão 7.1.1.14 (CDC, 2013). Para determinar a significância estatística, foi utilizado o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e $p<0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

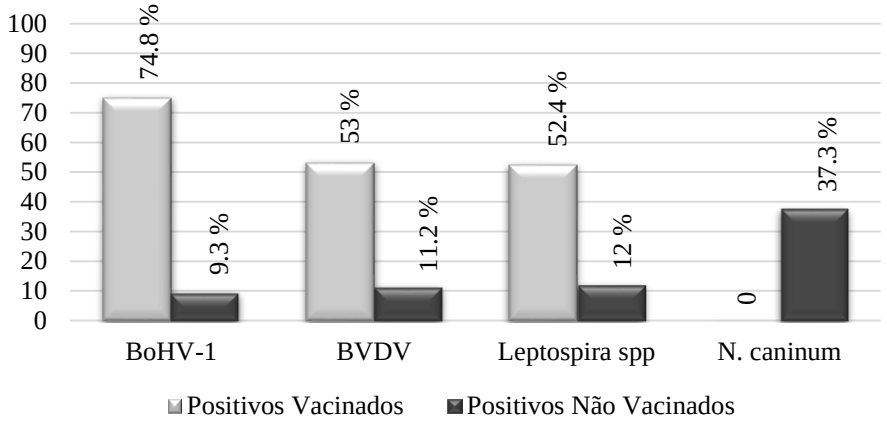
Das 405 amostras coletadas, 147 foram provenientes de 29 (26,6%) propriedades que fazem uso de vacinação contra BoHV-1, BVDV e *Leptospira* spp., e 258 foram de animais não vacinados pertencentes à 80 (73,4%) propriedades do município. Assim, as

amostras foram divididas em dois extratos, de acordo com o *status* vacinal do rebanho, para a interpretação dos resultados (Fig.1).

Considerando-se apenas as amostras de animais não vacinados, as prevalências de anticorpos contra BoHV-1 e BVDV foram de 9,3% e 11,2% respectivamente, ficando entre os menores índices relatados no RS. Todas as reações positivas contra BoHV-1 tiveram títulos ≤32, já contra o BVDV, 62% apresentaram títulos ≥32.

Os estudos de Holz *et al*. (2009) mostraram os baixos índices de positividade para o BoHV-1 da região noroeste do RS quando comparada à outras partes do estado, visto que encontraram uma prevalência de 19,6%, valor 35% menor do que a média estadual. No entanto, os achados do presente estudo foram surpreendentes, pois se esperavam índices próximos a 30% para ambos os vírus, semelhantes aos encontrados por Poletto *et al.* (2004) no município de Passo Fundo, localizado na mesma região.

Figura 1. Relação de animais com presença de anticorpos de acordo com o *status* vacinal do rebanho.



Aumentos da circulação viral estão comumente associados a altas taxas de lotação, manejo intensivo de animais e compra de animais para reposição (Dias *et al.*, 2008). No município, 90% das propriedades estudadas caracterizam-se como de pequeno porte, com área destinada à pecuária com ≤20 hectares, sendo 83% delas possuindo menos de 20 animais em ordenha, criados em sistema semi-intensivo. É provável que o próprio perfil dos estabelecimentos, em que a circulação e a aglomeração de animais não são comuns, tenha contribuído para a baixa prevalência de anticorpos contra o BoHV-1 e o BVDV. Além disso, 58% das propriedades utiliza apenas inseminação artificial e por isso não possuem touro na propriedade. Este fato diminui o risco de transmissão da doença, já que

estes animais tendem a apresentar maiores taxas de positividade e atuam como disseminadores dessas enfermidades (Dias *et al.*, 2008).

Entre os animais vacinados, 74,8% apresentaram sorologia positiva para o BoHV-1 e 53% para BVDV. Não existem no Brasil normas que determinem a titulação mínima de anticorpos que vacinas contra esses vírus devam ser capazes de induzir. Assim, levando-se em conta a regulamentação norte americana, vacinas inativadas e/ou atenuadas contra o BoHV ou BVDV devem induzir títulos ≥8 em ao menos 80% de animais (US GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE, 2016). Com base nisso, observamos que 42,1% e 51,5% dos bovinos não estavam protegidos contra o BoHV-1 e o BVDV, respectivamente. Sendo que, 25,1% das amostras foram negativas contra BoHV-1 e 46% contra o BVDV pelos métodos testados, não havendo detecção de anticorpos neutralizantes. O número de animais e a respectiva titulação de anticorpos observados na SN, para os dois vírus, de acordo com tempo transcorrido entre a data da vacinação e a coleta das amostras, é apresentada na Tab.2. As titulações encontradas neste estudo são bem próximas às encontradas por Becker *et al.* (2015) onde, das amostras de animais vacinados coletadas no ano de 2014, 44,5% não estavam protegidos contra a infecção por BoHV-1 e BVDV, considerando o mesmo ponto de corte.

Tabela 2. Títulos encontrados através da soroneutralização em amostras de bovinos vacinados contra o BoHV-1 e BVDV, de acordo com o período transcorrido em meses.

	Meses após a vacina									
Título	**1-3**		**4-6**		**7-9**		**10-12**		**Total**	
	BoHV	**BVDV**	**BoHV**	**BVDV**	**BoHV**	**BVDV**	**BoHV**	**BVDV**	**BoHV**	**BVDV**
0	11	21	12	25	10	17	4	6	37 (25,1%)	69 (46%)
2	2	2	6	1	4	2	1	2	13 (8,8%)	7 (4,8%)
4	3	1	4	0	5	0	0	0	12 (8,2%)	1 (0,7%)
8	4	3	6	5	4	1	1	1	15 (10,2%)	10 (6,8%)
16	8	2	6	1	4	3	3	0	21 (14,3%)	6 (4,1%)
32	9	2	2	0	4	4	1	0	16 (10,9%)	6 (4,1%)
64	8	6	6	2	1	2	0	0	15 (10,2%)	10 (6,8%)
128	10	9	1	4	1	2	0	0	12 (8,2%)	15 (10,2%)
≥256	6	15	0	5	0	2	0	1	6 (4,1%)	23 (15,6%)
Total	**61**	**61**	**43**	**43**	**33**	**33**	**10**	**10**	**147**	**147**

Parte destes achados estão relacionados às vacinas comerciais vendidas no Brasil, que contêm cepas inativadas de BVDV-1 isolados nos Estados Unidos, possuindo

reduzida eficácia frente às amostras de campo brasileiras (Lima *et al*., 2005). A baixa reatividade sorológica entre as cepas ocorre devido às diferenças antigênicas existentes entre os isolados, especialmente quando se tratarem de genótipos distintos (BVDV-2) (Vogel *et al.*, 2002). Já para Silva *et al.* (2007) a baixa capacidade imunogênica de grande parte das vacinas comercias contra o BoHV-1 pode ser consequência de uma série de fatores como: baixa concentração de antígeno, a metodologia utilizada na inativação, formulação, concentração de adjuvantes e eficiência na emulsificação dos antígenos.

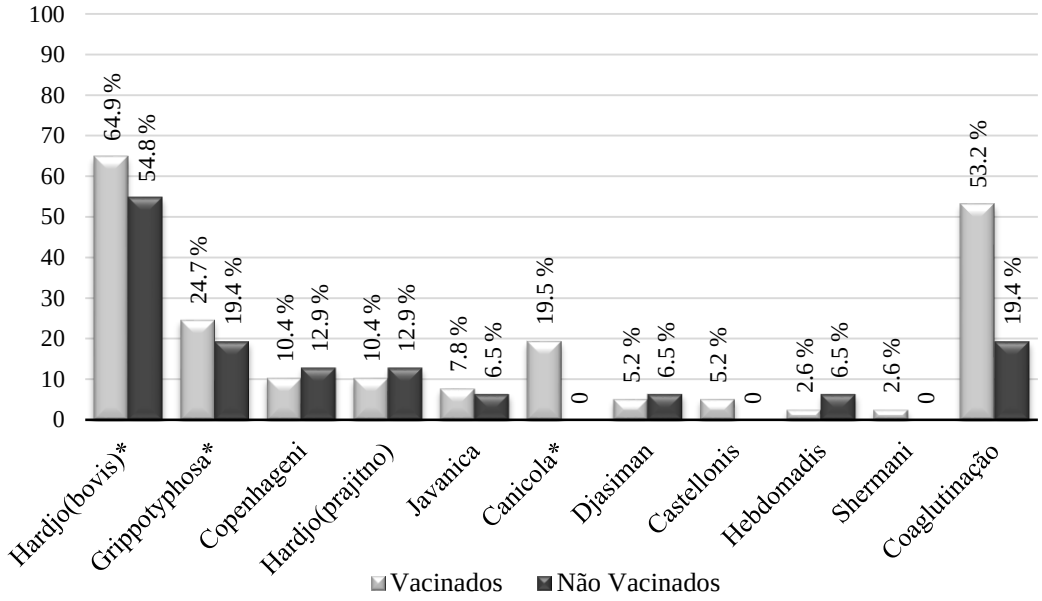
Os resultados obtidos na pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. demonstraram positividade de 52,4% entre os animais vacinados que conforme o esperado, apresentaram maior prevalência dos sorovares Hardjo, Grippotyphosa e Canicola, por fazerem parte da vacina comercial utilizada. Entre os não vacinados, 12% foram positivos, com predominância do sorovar Hardjo e elevada ocorrência de coaglutinações (30,2%) (Fig.2). Não houve títulos superiores a 1:100 contra os sorovares Autumnalis, Tarassovi e Panama. Estes resultados diferem dos obtidos por Hermann *et al.* (2012), que encontraram 38,75% de positividade ao analisarem amostras de soros de bovinos nas regiões sudeste e sudoeste do RS. Sarmento *et al.* (2012) também evidenciou maior prevalência de infecção, utilizando uma coleção com 23 antígenos de referência e 10 autóctones, com 51,74% de reações positivas. No entanto em ambos os estudos o sorovar mais prevalente foi Hardjo, com valores próximos à 30%.

Na pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* obtivemos uma prevalência de 37,3% dos animais e 67,9% das propriedades possuíam pelo menos um animal positivo. Estes índices demonstram a ampla circulação do protozoário nos rebanhos, principalmente quando comparado aos achados de Corbellini *et al.* (2006), que detectaram 17,8% e Vogel *et al.* (2006) que observaram 11,4% de positividade em rebanhos do RS. No entanto, os resultados obtidos neste estudo foram inferiores aos reportados por Camillo *et al.* (2011), com 53,3% de amostras positivas em rebanhos leiteiros na região central do estado.

O questionário epidemiológico levou em consideração as variáveis com possível associação à presença de anticorpos contra os agentes infecciosos estudados, respeitando as particularidades de cada um. Do total de animais objeto do estudo, 75% (304) apresentaram algum sinal de distúrbio reprodutivo e 35,1% (142) foram positivos para ao

menos uma das quatro enfermidades. O período de gestação com maior número de abortos foi o 2º trimestre (57%), seguindo pelo 3º trimestre (22%) e 1º trimestre (21%).

Figura 2. Distribuição dos sorovares de *Leptospira* spp., em soros de bovinos vacinados (n=147) e não vacinados (n=258) com reação positiva ao MAT.



*Vacina composta por bacterina dos sorovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona.

Analisando as informações obtidas pela aplicação do questionário epidemiológico, observou-se associação entre soropositividade contra o BoHV-1 e as seguintes variáveis: utilização de piquete maternidade (OR:3,75; IC:1,59-8,85; p:0,001), mães ou avós com histórico de aborto (OR:4,81; IC:1,85-12,52; p<0,001), fomento reprodutivo por veterinário (OR:4,5; IC:1,84-11,01; p<0,001) e uso de adsorvente de micotoxinas (OR:3,7; IC:1,09-12,54; p:0,02). A variável local fixo de alimentação no comedouro atuou como fator de proteção contra a infecção pelo BoHV-1 (OR:0,37; IC:0,14-0,98; p:0,03), provavelmente associada à diminuição do contato com secreções nasais entre os animais.

Tiveram associação com a infecção pelo BVDV: utilização de piquete maternidade (OR:2,51; IC:1,13-5,53; p:0,01), mães ou avós com histórico de aborto (OR:3,58; IC:1,42-9,04; p:0,004), presença de animais silvestres (OR:4,03; IC:0,92-17,5; p:0,04) e histórico de retorno ao cio (OR:1,00; IC:0,44-2,25; p<0,001). A prevalência de leptospirose teve associação apenas com a realização de fomento reprodutivo por veterinário (OR:3,61; IC:1,19-10,93; p:0,01) e presença de animais silvestres (OR:4,68;

IC: 2,03-10,76; p<0,001). Já as variáveis correlacionadas com a presença de animais positivos para *N. caninum* foram: histórico de aborto (OR:3,33; IC:1,91-5,82; p<0,001), mães ou avós com histórico de aborto (OR:2,17; IC:1,23-3,84; p:0,006) e presença de piquete maternidade (OR:1,50; IC:1,00-2,25; p:0,048).

As variáveis realização de fomento reprodutivo por veterinário e uso de adsorvente de micotoxinas mostraram-se associadas à infecção, contudo a adoção destas práticas se deu, provavelmente, como uma medida de controle devido à anterior ocorrência de sinais clínicos. Sugerido pela associação positiva que ocorreu entre a variável uso de vacinação e as variáveis histórico de aborto (OR:2,03; IC:1,18-3,50; p <0,01) e histórico de retorno ao cio (OR:2,14; IC:1,32-3,46; p <0,01). Bem como a associação entre histórico de aborto e uso de adsorvente de micotoxinas (OR:2,79; IC:1,21-6,40; p:0,01). Demonstrando que estas medidas foram adotadas por produtores que já apresentavam problemas reprodutivos no rebanho, como tentativa de amenizar os problemas reprodutivos enfrentados na propriedade.

O aborto e o retorno ao cio são os principais sinais clínicos de doença reprodutiva. Sua ocorrência é resultante de uma alta taxa de infecção no feto e seus envoltórios, constituindo a principal fonte de infecção para outros animais. Além disso, fêmeas infectadas podem transmitir a doença aos seus descendentes por via transplacentária ou pelo contato direto após o parto (Radostits *et al.*, 2000). Assim, estes sinais são as variáveis de maior associação com a presença de animais soropositivos e por isso tidos como indicadores da presença de doenças infecciosas nos rebanhos (Marques *et al.*, 2010; Bruhn *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013). Este é um fator altamente relevante e pôde ser evidenciado pela associação das variáveis histórico de aborto e mães ou avós com histórico de aborto com a soropositividade dos animais. Além disso, houve correlação também das duas variáveis entre si (OR:2,57; IC:1,33-4,95; p<0,005), evidenciando que vacas filhas de mães ou avós que abortaram tem maior probabilidade de abortarem, bem como de serem soropositivas para BoHV-1, BVDV ou *N. caninum*.

A utilização de piquete maternidade é uma medida que auxilia na assistência ao parto e ao recém-nascido. Contudo, necessita de práticas de controle de contaminação cruzada entre os animais, já que há associação entre o alto potencial infectante dos fluidos e envoltórios fetais com o agrupamento de animais em fase de imunossupressão devido ao parto. Fatos relatados também por Quincozes *et al.* (2007) e Dias *et al.* (2013).

A associação observada entre a presença de animais silvestres e a soropositividade do rebanho tem sido confirmada por diversos estudos que também identificaram esta variável como fator de risco para a transmissão de doenças aos bovinos (Marques *et al.*, 2010; Pimenta *et al.*, 2014). Isso acontece porque animais silvestres, além de serem considerados reservatórios naturais de uma série de patógenos, podem atuar como vetores mecânicos participando de maneira significativa do ciclo epidemiológico destas doenças.

CONCLUSÕES

O município de Novo Xingu apresentou baixa prevalência de infecção por BoHV-1, BVDV e *Leptospira* spp, e acentuada ocorrência de infecção por *Neospora caninum*. Os resultados dos exames sorológicos foram repassados aos produtores, que receberam uma capacitação sobre particularidades das enfermidades, possibilidades de tratamento, vacinação, destino de envoltórios fetais e demais medidas de controle e prevenção a serem adotadas em cada propriedade, com base nas variáveis aqui identificadas. A baixa titulação de anticorpos vacinais encontrada sugere que estudos controlados devem ser implementados para melhor avaliar a proteção induzida por algumas vacinas comerciais.

REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; PEREIRA, A. R. et al. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.19, n.2, p.119-123, 2010.

BECKER, A.S.; RODRIGUES, M.G.; ORLANDIN, J.R. et al. Anticorpos neutralizantes contra o herpesvirus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina em bovinos vacinados e não vacinados da região sul do estado do Rio Grande do Sul. *Science and Animal Health*, v.3, n.2, p.209-220, 2015.

BRUHN, F. R. P.; TEÓFILO, T. da S.; GUIMARÃES, K. A. V. et al. Neosporose em ruminantes. *PUBVET*, v.6, n.2, Art. 1276, 2012.

CAMILLO, G.; CEZAR, A. S.; ANTONELLO, A. M. et al. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.6, p.482-486, 2011.

CORBELLINI, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A. 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, 2006.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; FERREIRA-NETO, J. S. et al. Seroprevalence and risk factors of bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the state of Paraná, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.60, n.1, p.39-47, 2013.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C. et al. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.3, p.161-168, 2008.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P.L. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, v.25, n.7, p.1250-1256, 2007.

FLORES, E. F. Virologia veterinária. Santa Maria: Editora UFSM, 2007.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, v.66, n.3, p.648-654, 2006.

HERRMANN, G. P.; RODRIGUES, R. O.; MACHADO, G. et al. Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v.13, n.1, p.131-138, 2012.

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F. et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.9, p.767-773, 2009.

IBGE. Produtos de origem animal, por tipo de produto. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/74#resultado>. Acesso em: 22 jan.2017.

JONES, C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, n.1, p.79-95, 2003.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F. Z. et al. Detection of *Leptospira* spp.in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology*, v.69, n.7, p.837-42, 2008.

LIMA, M. De; VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. *Ciência Rural*, v.35, n.1, p.230-234, 2005.

MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; DE BRITO, W. M. E. D. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.3, p.607-617, 2010.

NICOLINO, R. R.; CAPANEMA, R. O.; OLIVEIRA, C. S. F. de. et al. Estimating the abortion risk difference in *Neospora caninum* seropositive dairy cattle in Brazil. *Ciência Rural*, v.45, n.9, p.1629-1633, 2015.

OLIVEIRA, S. V.de; ARSKY, M. de L. N.S.; CALDAS, E. P.de. Reservatórios animais da leptospirose: uma revisão bibliográfica. *Saúde (Santa Maria)*, v.39, n.1, p.9-20, 2013.

PIMENTA, C. L. R. M.; CASTRO, V.; CLEMENTINO, I. J. et al. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.4, p.332-336, 2014.

POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural*, v.34, n.2, p.595-598, 2004.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. de O. et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*, v.28, n.2, p.269, 2007.

RADOSTITS, OTTO M.; GAY, CLIVE C.; BLOOD, DOUGLAS C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SARMENTO, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M. et al. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v.32, n.7, p.601-606, 2012.

SILVA, L. F. da; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Ciência Rural*, v.37, n.5, p.1471-1474, 2007.

US GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE. Code of Federal Regulations, Title 9 - Animals and Animal Products, Chapter I, SubchapterE, Part 113, Section § 113.215-216. Disponível em:<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR&searchPath=Title+9%2FChapter+I%2FSubchapter+E%2FPart+113%2FSubjgrp&oldPath=Title+9%2FChapter+I%2FSubchapter+E%2FPart+113&isCollapsed=true&selectedYearFrom=2016&ycord=932>. Acesso em: 20 jan.2017

VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v.36, n.6, p.1948-1951, 2006.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. *Ciência Rural*, v.32, n.5, p.881-883, 2002.

WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva. *Anais*... Geneva: World Health Organization, 2003. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42667/1/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf

4 Considerações Finais

De acordo com a literatura consultada o BoHV-1, o BVDV, a *Leptospira* spp. e o *N. caninum* encontram-se disseminados no rebanho bovino da região Sul do Brasil, com uma prevalência média de 47,7%, 34,9%, 41,3% e 23,6%, respectivamente. No entanto, neste estudo foram observadas frequências das doenças víricas e bacteriana abaixo desta média, com valores até 80% menores. Em contrapartida, houve uma ocorrência mais significativa de anticorpos para *N. caninum* no rebanho, com ocorrência 57% maior em relação à média da região Sul.

A baixa titulação de anticorpos vacinais encontrada sugere que estudos controlados devem ser implementados para melhor avaliar a proteção induzida por algumas vacinas comerciais. Além disso a qualidade das vacinas utilizadas nos protocolos de vacinação deverão ser revistas, de modo a ampliar a proteção imunológica do rebanho.

Dentre as variáveis estudadas houve maior associação com a soropositividade do rebanho: o histórico de aborto, histórico de retorno ao cio, utilização de piquete maternidade, mães ou avós com histórico de aborto e presença de animais silvestres.

Em seguida, de posse dos resultados, estes foram repassados aos produtores locais, que foram instruídos quanto as medidas de controle necessárias de acordo com a sua realidade. Abordando-se temas como transmissão, vacinação, possibilidades de tratamento, condutas relacionadas aos animais doentes e destino de fetos abortados e envoltórios fetais. Além do uso de equipamentos de proteção individual no auxílio ao parto, e demais medidas de prevenção e controle das principais doenças reprodutivas dos bovinos a serem adotadas em cada propriedade, com base nas variáveis aqui identificadas.

Referências

ABE, Y.; TAMURA, T.; TORII, S.; WAKAMORI, S.; NAGAI, M.; MITSUHASHI, K.; MINE, J.; FUJIMOTO, Y.; NAGASHIMA, N.; YOSHINO, F.; SUGITA, Y.; NOMURA, T.; OKAMATSU, M.; KIDA, H.; SAKODA, Y. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 1, p. 61–70, 2016.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. de la P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, jan. 2010.

AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ARNAIZ-SECO, I.; REBORDOSA-TRIGUEROS, X.; NAVARRO-LOZANO, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3–4, p. 182–195, nov. 2008.

ANDRADE, G. I.; SERRA, C. V.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; SERAKIDES, R.; LOBATO, Z. I. P. Padronização da técnica de imunoistoquímica para o diagnóstico etiológico de rotina da diarréia bovina a vírus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 710–714, out. 2005.

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; PAIVA, F. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. **Embrapa**, Documento 136, 2003

ARDUINO, G. de G. C.; GIRIO, R. J. S.; MAGAJEVSKI, F. S.; PEREIRA, G. T. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 575–582, 2009.

ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; KO, A. I.; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira* interrogans. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176–180, fev. 2008.

AZEVEDO, S. S. de; PENA, H. F. de J.; ALVES, C. J.; GUIMARÃES FILHO, A. A. de M.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from

Northeastern Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 19, n. 2, p. 80–84, 2010.

BARBOSA, A. C. V. da C.; BRITO, W. M. E. D. de; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo Herpesvirus Bovino Tipo-1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1368–1373, dez. 2005.

BARLING, K. S.; SHERMAN, M.; PETERSON, M. J.; THOMPSON, J. A.; MCNEILL, J. W.; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 9, p. 1361–1365, nov. 2000.

BARR, B. C. .; ANDERSON, M. L. .; SVERLOW, K. W. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with na indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, v. 137, n. 24, p. 611–613, 1995.

BARTELS, C. J. M.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 247–257, jul. 1999.

BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S. E.; ZIMMER, I. A.; ROY, S.; KITCHENER, A. C.; MEREDITH, A.; INNES, E. A.; KATZER, F. Detection of *Neospora caninum* in wild carnivorans in Great Britain. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 279–283, fev. 2013.

BECKER, A.S.; RODRIGUES, M.G.; ORLANDIN, J.R.; MENEZES, P.Q.; MATOS, C.S.; WILSMANN, D.E.; VIANA, A.E.; RODRIGUES, P. R. C. Anticorpos neutralizantes contra o herpesvirus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina em bovinos vacinados e não vacinados da região sul do estado do Rio Grande do Sul. **Science and Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 209–220, 2015.

BELLI, S. I. .; SMITH, N. C. .; FERGUSON, D. J. P. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 416–423, set. 2006.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: A Zoonotic Disease of Global Importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 1 dez. 2003.

BJERKAS, I. .; MOHN, S. F. .; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd**, v. 70, p. 271–274, 1984.

BOELAERT, F.; SPEYBROECK, N.; KRUIF, A. de; AERTS, M.; BURZYKOWSKI, T.; MOLENBERGHS, G.; BERKVENS, D. L. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, n. 3–4, p. 285–295, jul. 2005.

BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P. L.; DA SILVA PINTO, L.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. de F. C.; BERNE, M. E. A. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 33–38, 2011.

BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira* mayottensis sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 12, p. 4061–4067, 1 dez. 2014.

BREWOO, J. N.; HAASE, C. J.; SHARP, P.; SCHULTZ, R. D. Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Immunology** and Immunopathology, v. 115, n. 3–4, p. 369–374, fev. 2007.

BROD, C. S. .; MARTINS, L.F.S.; NUSSBAUM, J.R.; FEHLBERG, M. F. B. .; FURTADO, L.R.I.; ROSADO, R. L. I. Leptospirose bovina na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 14, p. 15–20, 1995.

BRUHN, F. R. P. **Fatores de risco associados à soroprevalência de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no estado de Minas Gerais, Brasil.** 2012. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias - Universidade Federal de Lavras, 2012.

BRUM, L. P.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C. F. C.; KREUTZ, L. C.; DÜRR, J. W.; QUADROS, V. L. De; LIMA, M. De; MAZZUTTI, K. C.; PAN, K. A. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em amostras de tanques de leite de rebanhos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 1–2, p. 84–87, 2004.

BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2012. p. 54–82.

CAMILLO, G.; CEZAR, A. S.; ANTONELLO, A. M.; SANGIONI, L. A.; FLORES, E. F.; PEREIRA, G. R.; GONÇALVES, P. B. D.; VOGEL, F. S. F. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 482–486, jun. 2011.

CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; HÜBNER, S. O.; OLIVEIRA, M. T.; SILVA, A. D.; ESTEVES, P. A.; ROEHE, P. M.; RIJSEWIJK, F. A. M. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 67–73, 2009.

CARLTON, W. W.; MCGALVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de thomson**. 2º ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda, 1998.

CARVAJAL-DE LA FUENTE, V.; ZAPATA-CAMPOS, C.; RIGOBERTO, J. L. O.; JOSÉ, L. Z.; JASSO-OBREGÓN, O.; MARTÍNEZ-BAUTISTA, E. Seroprevalence and risk factors associated with leptospirosis (*L. Interrogans*) in bovine cattle in Northeastern Mexico. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, n. 1, p. 7–12, 2012.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S.; GOTTI, T.; BATISTA, C.; GENTILI, J.; MORAIS, Z.; VASCONCELLOS, S.; GENOVEZ, M. Fatores de risco para a leptospirose em femeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de Sao Paulo; Risk factors to leptospirosis in cows in Sao Paulo state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1438–1442, 2009.

CAVAZINI, N. C.; SALDANHA, G. B.; SILVA, A. S.; FERNANDES, M. B.; RENATO, M.; BADKE, T.; PIVETA, C. G. Eficiência Reprodutiva de Vacas com Leptospirose após tratamento com sulfato de estreptomicina. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, p. 152–159, 2008.

CHASE, C. C. .; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. . The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantlychanging picture. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 95–114, mar. 2004.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E. de; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. de 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, n. 6, p. 1448–1451, jun. 2010.

CHIRATHAWORN, C.; KONGPAN, S. Review article Immune responses to *Leptospira* infection : roles as biomarkers for disease severity. **The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES**, v. 8, n. 1, p. 77–81, 2013.

CONNOLLY, S. A.; JACKSON, J. O.; JARDETZKY, T. S.; LONGNECKER, R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 369–381, 11 maio 2011.

CORBELLINI, L. .; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F. .; GONDIM, L. F. .; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 195–202, jan. 2002.

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, n. 2–3, p. 130–141, 2006.

DAFT, B. M.; BARR, B. C.; COLLINS, N.; SVERLOW, K. Neospora encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 3, p. 240–243, maio 1997.

DARWICH, L.; CABEZÓN, O.; ECHEVERRIA, I.; PABÓN, M.; MARCO, I.; MOLINA-LÓPEZ, R.; ALARCIA-ALEJOS, O.; LÓPEZ-GATIUS, F.; LAVÍN, S.; ALMERÍA, S. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 377–381, fev. 2012.

DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z.; AFONSO, C. L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10339–10347, 2003.

DIAS, F. C.; SÂMARA, S. I. Aspectos Relevantes Da Infecção Pelo Vírus Da Diarréia Viral Bovina (Bvdv). **Biológico**, v. 72, n. 1, p. 1–9, 2010.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; FERREIRA-NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; MULLER, E. E. Seroprevalence and risk factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in cattle herds in the state of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 1, p. 39–47, fev. 2013.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C.; FREITAS, J. C.; FERREIRA NETO, J. S.; MÜLLER, E. E. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvirus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 161–168, 2008.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. .; EYSKER, M.; BEIBOER, M. .; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 3–4, p. 161–169, jan. 2003.

DUBEY, J. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929–946, jul. 2002.

DUBEY, J. .; ZARNKE, R.; THOMAS, N. .; WONG, S. .; BONN, W. V.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. .; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. .; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii, Neospora caninum*, Sarcocystis neurona, and Sarcocystis canis-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 275–296, out. 2003.

DUBEY, J. P. Recent advances in Neospora and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3–4, p. 349–367, ago. 1999.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1, 2003.

DUBEY, J. P. .; CARPENTER, J. L. .; SPEER, C. A. .; TOPPER, M. J. .; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269–1285, 1988.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 267–289, 2006.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; VERMA, S. K.; KWOK, O. C. H.; FETTERER, R.; BUTLER, E.; CARSTENSEN, M. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (Canis lupus). **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1–2, p. 150–153, mar. 2014.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (Canis lupus) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 382–387, set. 2011.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1–2, p. 1–59, dez. 1996.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1–2, p. 90–108, ago. 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323–367, 1 abr. 2007.

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

ELLINGHAUSEN, H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira* Pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American journal of veterinary research**, v. 26, p. 45–51, jan. 1965.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira* and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci, 1999.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. a; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; NETO, J. S. F.; MEDICINA, F. De; SÃO, U. De; PROF, A.; MARQUES, O.; PAULO, S.; FAPESP, B. B. Leptospirose Bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29–35, 2001.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDERT, M. J.; WHITE, D. O. Flaviviridae. In: **Veterinary Virology**. 2º ed. Cap.1, 3-17. cap 25, 441-456.

FIGUEIREDO, A. de O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M. de; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 375–381, maio 2009.

FINO, T. C. M.; DE MELO, C. B.; RAMOS, A. F.; LEITE, R. C. Diarréia bovina a vírus (bvd) - uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, v. 34, n. 2, p. 131–140, 2012a.

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, n. 2, p. 122–127, 2012b.

FINO, T.; MELO, C.; RAMOS, A.; MCMANUS, C.; LEITE, R.; MARTINS, E. Ocorrence of Antibodies Against Bovine Herpesvirus 1 and Bovine Viral Diarrhoea Virus in Crioula Lageana Cattle. **Journal of Animal Science Advances**, v. 3, n. 4, p. 165, 2013.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125–134, set. 2005.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M.; VARELA, A. P. M. Herpesviridae. In: **Virologia Veterinária**. 2ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 503–570.

FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; SPAGNOLO, J.; KUSE, N.; FIORI, C.; SCORTEGAGNA, G. T.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C. Prevalência De Leucose Enzoótica Bovina , Diarréia Viral Bovina , Rinotraqueíte Infecciosa Bovina E Neosporose Bovina Em 26 Propriedades Leiteiras Da Região Nordeste Do Rio Grande Do Sul , Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1102–1106, 2008.

FREITAS, E. J. P. de; LOPES, C. E. R.; MOURA FILHO, J. M. de; SÁ, J. S.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. D. M. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1301, 23 jun. 2014.

GABEV, E.; TOBLER, K.; ABRIL, C.; HILBE, M.; SENN, C.; FRANCHINI, M.; CAMPADELLI-FIUME, G.; FRAEFEL, C.; ACKERMANN, M. Glycoprotein D of Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) Confers an Extended Host Range to BoHV-1 but Does Not Contribute to Invasion of the Brain. **Journal of Virology**, v. 84, n. 11, p. 5583–5593, 1 jun. 2010.

GIANGASPERO, M.; WELLEMANS, G.; VANOPDENBOSCH, E.; BELLOLI, A.; VERHULST, A. BOVINE VIRAL DIARRHOEA. **The Lancet**, v. 332, n. 8602, p. 110, jul. 1988.

GONDIM, L. F. .; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (Canis latrans) are definitive hosts of *Neospora caninum.* **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159–161, fev. 2004a.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 33–39, nov. 2005.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.; MECH, L. D.; NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1361–1365, dez. 2004b.

GONDIM, L. S. Q.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R. S.; SILVA, M. S. A.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; GONDIM, L. F. P. *Toxoplasma gondii* and N*eospora caninum* in sparrows (Passer domesticus) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1–2, p. 121–124, fev. 2010.

GRAHAM, D. A.; CLEGG, T. A.; LYNCH, M.; MORE, S. J. Herd-level factors associated with the presence of bovine viral diarrhoea virus in herds participating in the voluntary phase of the Irish national eradication programme. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 1–2, p. 99–108, 1 out. 2013.

GUIMARÃES, 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, n. 1–2, p. 1–8, set. 2004.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. da S.; ROMANELLI, P. R. Neosporose em Animais Domésticos Neosporosis in domestic animals. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 665–678, 2006.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados a *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99–105, 2012.

HENZEL, A.; DIEL, D. G.; ARENHART, S.; VOGEL, F. S. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras infectadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 140–148, mar. 2008.

HERRMANN, G. P.; RODRIGUES, R. O.; MACHADO, G.; MOREIRA, E. C.; LAGE, A.; LEITE, R. C. Soroprevalencia de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado Rio Grande do Sul, BRASIL. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 131–138, 30 mar. 2012.

HILBE, M.; STALDER, H.; PETERHANS, E.; HAESSIG, M.; NUSSBAUMER, M.; EGLI, C.; SCHELP, C.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhea virus infection in calves. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 19, n. 1, p. 28–34, jan. 2007.

HILL, F. I.; REICHEL, M. P.; TISDALL, D. J. Use of molecular and milk production information for the cost-effective diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in New Zealand dairy cattle. **Veterinary microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 87–9, 21 abr. 2010.

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, H. B. C. R.; CAMPOS, F. S.; SILVA, J. R.; 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 Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767–773, 2009.

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497–504, nov. 2002.

JAFARI DEHKORDI, A.; SHAHBAZKIA, H.; RONAGH, N. Evaluation of pathogenic serovars of *Leptospira* interrogans in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. **Iranian journal of microbiology**, v. 3, n. 3, p. 135–9, set. 2011.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic letospires. I. Growth at low temperatures. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27–31, 1967.

JONES, C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 79–95, 1 jan. 2003.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina Ciencias Agrarias**, v. 27, n. 2, p. 289–298, 2006.

KING,ANDREW M.Q.; LEFKOWITZ, ELLIOT; ADAMS, MICHAEL J.; CARSTENS, E. B. (ed.). Herpesviridae. In: **Virus Taxonomy**. 1ª ed. San Diego, CA: Elsevier, 2012. p. 111–122.

KING, J. S.; ŠLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945–950, jul. 2010.

LANG-REE, J.; VATN, T.; KOMMISRUD, E.; LOKEN, T. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Rectal Examination. **Veterinary Record**, v. 135, n. 17, p. 412–413, 22 out. 1994.

LANGONI, HELIO; SILVA, ARISTEU VIEIRA DA; KATAGIRI, SATIE; CAGNINI, FRANKI; RIBEIRO, C. M. Avaliação sorológica para *Neospora caninum* em propriedades de bovinos leiteiros com alterações reprodutivas. v. 20, n. 1, p. 124–130, 2013.

LANYON, S. R.; HILL, F. I.; REICHEL, M. P.; BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 201–209, fev. 2014.

LARSON, R. Management Systems and Control Programs. In: **Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1º ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005. p. 223–238.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 1 abr. 2001.

LEVETT, P. N. Reclassification of *Leptospira* parva Hovind-Hougen et al. 1982 as Turneriella parva gen. nov., comb. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1497–1499, 2005.

LEVINGS, R. L.; COLLINS, J. K.; PATTERSON, P. A.; ROTH, J. A. Virus, strain, and epitope specificities of neutralizing bovine monoclonal antibodies to bovine herpesvirus 1 glycoproteins gB, gC, and gD, with sequence and molecular model analysis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 164, n. 3–4, p. 179–193, 2015.

LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 3, p. 249–251, dez. 2003.

LINDBERG, A. L. E. Bovine viral Diarrhoea virus infections and its control. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 25, n. 1, p. 1–16, mar. 2003.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. . A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521–1523, out. 1999.

LLANO, H. A. B. **Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas leiteiras da microrregião leste do estado de antioquia-colômbia**. 2015. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal-Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

LOBATO, J.; SILVA, D. a O.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H. F.; SEGUNDO, G. R. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84–89, 1 jan. 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; MACHADO JR, P. C.; FRIDLUND-PLUGGE, N.; RICHARTZ, R. R. T. B. .; MONTIANI-FERREIRA, F.; PATRÍCIO, L. F. L. .; PATRÍCIO, M. A. C. .; JOINEAU, M. G. .; PIEPPE, M. Determinação e correlação de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná , Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 191–196, 2008.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493–1494, dez. 2001.

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, n. 3, p. 425–430, 1995.

MACEDO, C. A. B. de; MACEDO, M. F. S. B. De; CARDIM, S. T.; PAIVA, M. C. D. C.; TARODA, A.; BARROS, L. D.; CUNHA, I. A. L. Da; ZULPO, D. L.; GARCIA, J. L. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered dairy cows

(*Bos taurus*). **Revista brasileira de parasitologia veterinaria**, v. 22, n. 1, p. 13–7, 2013.

MACHADO, G.; EGOCHEAGA, R. M. F.; HEIN, H. E.; MIRANDA, I. C. S.; NETO, W. S.; ALMEIDA, L. L.; CANAL, C. W.; STEIN, M. C.; CORBELLINI, L. G. Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Dairy Cattle: A Matched Case-Control Study. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 1, p. e1–e13, fev. 2016.

MAINAR-JAIME, R. .; BERZAL-HERRANZ, B.; ARIAS, P.; ROJO-VÁZQUEZ, F. . Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 52, n. 1, p. 63–73, 2 nov. 2001.

MARINHO, M. Leptospirose: Fatores Epidemiológicos, Fisiopatológicos e Imunopatogênicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 428–434, 2008.

MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; DE BRITO, W. M. E. D.; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M.; JAYME, V. D. S. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 607–617, 2 out. 2010.

MARTIN, C. C.; BACCILI, C. C.; SILVA, B. T.; NOVO, S. M. F.; SOBREIRA, N. M.; PITUCO, E. M.; GOMES, V. Detection of Bovine Viral Diarrhea virus infection in newborn calves before colostrum intake. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1379, 22 jun. 2016.

MARTINS, A. A.; VIEIRA, A. Frequency and risk factors for infection by *Neospora caninum* in dairy farms of Umuarama , PR , Brazil. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 15, n. 2, p. 137–142, 2012.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. .; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are denitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473–1479, set. 1998.

MCBRIDE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, p. 376–386, 2005.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347–350, abr. 2000.

MELO, C. B.; LOBATO, Z. I. P.; CAMARGOS, M. F.; SOUZA, G. N.; MARTINS, N. R. S.; LEITE, R. C. Distribuição de anticorpos para herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 575–580, dez. 2002.

MESQUITA, M.; PELLEGRINI, D. C. P.; NETO, J. A. S. P.; REIS, G. R.; MEDEIROS, C.; CORBELLINI, L. G. Análise de série temporal para avaliação do perfil sorológico da Leptospirose bovina no estado do Rio Grande do Sul de 1996 a 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 381–387, 2006.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii.* **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23–39, jan. 2009.

MOENNIG, V.; LIESS, B. Pathogenesis of Intrauterine Infections With Bovine Viral Diarrhea Virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 477–487, nov. 1995.

MOLLEMA, L.; RIJSEWIJK, F. A. M.; NODELIJK, G.; DE JONG, M. C. M. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (Cervus elaphus) under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 1–2, p. 25–34, nov. 2005.

MOURA, A. B. .; SOUZA, A. P. .; SARTOR, A. A. .; BELLATO, V. .; TEIXEIRA, E. B. Anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en rebaños lecheros de la ciudad de Lages, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 44, p. 117–122, 2012.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R. S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 85–98, 29 jun. 2009.

NICOLINO, R. R.; CAPANEMA, R. O.; OLIVEIRA, C. S. F. de; PASTRANA, M. E. O.; LOPES, L. B.; HADDAD, J. P. A. Estimating the abortion risk difference in *Neospora caninum* seropositive dairy cattle in Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1629–1633, set. 2015.

NISKANEN, R.; LINDBERG, A. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Unhygienic Vaccination Procedures, Ambient Air, and from Contaminated Pens. **The Veterinary Journal**, v. 165, n. 2, p. 125–130, mar. 2003.

OECD/FAO. **Oecd-fao agricultural outlook 2016-2025**. Paris: OECD Publishing, 2016.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 312–316, jun. 2005.

OIE. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Chapter 2.4.12, 2016a.

OIE. Leptospirosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - Web Format**. World Organisation for Animal Health, p. 1–15, 2016b.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398–402, maio 2010.

OLIVEIRA, M. T.; CAMPOS, F. S.; DIAS, M. M.; VELHO, F. A.; FRENEAU, G. E.; BRITO, W. M. E. D.; RIJSEWIJK, F. A. M.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1139–1145, abr. 2011.

OLIVEIRA, R. A. M.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A. A.; LISBÔA, J. A. N. Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, p. 1217–1225, out. 2015.

ORLANDO, D. R. **Diagnóstico histopatológico, imuno- histoquímico e molecular das principais causas infecciosas de aborto em bovinos de minas gerais**. 2013. 2013.

OSHIRO, L. M.; MATOS, M. de F. C.; OLIVEIRA, J. M. de; MONTEIRO, L. A. R. C.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 133–138, set. 2007.

PASQUALOTTO, W.; SEHNEM, S.; WINCK, C. A. Incidência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose em Bovinos

Leiteiros da Região Oeste de Santa Catarina - Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 249, 3 ago. 2015.

PEREIRA, M. H. C.; RODRIGUES, A. D. P.; DE CARVALHO, R. J.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1454–1464, mar. 2014.

PEREIRA, M. M.; PEREIRA DA SILVA, J. J.; PINTO, M. A.; DA SILVA, M. F.; MACHADO, M. P.; LENZI, H. L.; MARCHEVSKY, R. S. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (Callithrix jacchus): A new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 13–20, 2005.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1–2, p. 159–163, nov. 2007.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1144–1148, ago. 2001.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1–9, jan. 2013.

PIMENTA, C. L. R. M.; CASTRO, V.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; FERNANDES, L. G.; BRASIL, A. W. L.; SANTOS, C. S. A. B.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 332–336, abr. 2014.

POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595–598, abr. 2004.

QUINCOZES, C. G. Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos Herpesvírus Bovino Tipo 1 E 5 (BHV-1 e 5) e pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória Do Palmar e Chuí. v. 5, p. 103, 2005.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. de O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 269, 30 out. 2007.

RADOSTITS, OTTO M.; GAY, CLIVE C.; BLOOD, DOUGLAS C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAGOZO, A.; PAULA, V. Ocorrência de Anticorpos Anti-*Neospora caninum* em Soros Bovinos Procedentes de Seis Estados Brasileiros. **Rev. Bras. Parasitol. …**, v. 12, n. 1, p. 33–37, 2003.

RAMOS, I. A. de S.; SILVA, R. J. da; MACIEL, T. A.; AFONSO DA SILVA, J. A. B.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; SOARES, P. C.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; MENDONÇA, C. L. de. Assessment of transplacental transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle in the Agreste region of Pernambuco. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 516–522, dez. 2016.

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133–142, fev. 2013.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 127–131, jun. 2003.

RIDPATH, J. F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. (Ed.). **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. p. cap. 3, p 65-80.

RIDPATH, J. F. .; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 564–591.

RIET-CORREA, FRANKLIN; SCHILD, ANA LUCIA; LEMOS, RICARDO ANTONIO; BORGES, J. R. J. **Doenças de ruminantes e equinos**. 3ª ed. Santa Maria: Fernovi, 2007.

RODRIGUES, C. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. De. Leptospirose bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 309–314, jun. 1999.

RYAN, E.; LEONARD, N.; O'GRADY, L.; DOHERTY, M. L.; MORE, S. J. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo seroprevalence in Beef/Suckler herds in the Republic of Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v. 65, n. 1, p. 6, 2012.

SALGADO, M.; OTTO, B.; SANDOVAL, E.; REINHARDT, G.; BOQVIST, S. A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 126, 2014.

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 69–83, mar. 2004.

SALIKI, J. T.; HUCHZERMEIER, R.; DUBOVI, E. J. Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 358–63, 2000.

SANDVIK, T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1–2, p. 3–16, nov. 2005.

SANTANA, R. C. M.; MASSA, R.; ZAFALON, L. F.; MEGID, J.; LANGONI, H.; MATHIAS, L. A. Epidemiologic study on the reproductive losses in dairy cattle: occurrence of *Neospora caninum*, Brucella abortus, Bovine Herpesvirus Type-1 and *Leptospira* spp. in a propriety of São Carlos city / Estudo epidemiológico sobre as perdas reprodutivas em ... **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 153, 26 dez. 2013.

SANTOS, A. P. M. E. .; NAVARRO, I. T. .; BRACARENSE, A. P. F. R. L. .; FREIRE, R. L. .; MARANA, E. R. M. .; OGAWA, L.; ALFIERI, A. A. . .; FREITAS, J. C. .; VIDOTTO, O. Dairy cow abortion associated with *Neospora caninum* and other infectious agents. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 545–547, ago. 2005.

SARMENTO, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; OLIVEIRA, F. C. S.; GONÇALES, A. P.; MIRAGLIA, F.; VASCONCELLOS, S. A. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 601–606, 2012.

SARTOR, I. F.; FILHO, A. G.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; PAI, V. D.; SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, p. 413–418, 2005.

SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; DÜRR, J. W.; BRUM, L. P.; QUADROS, V. L.; LIMA, M. de. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 45–50, abr. 2002.

SCHOONMAN, L.; SWAI, E. S. Herd- and animal-level risk factors for bovine leptospirosis in Tanga region of Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 7, p. 1565–1572, 3 out. 2010.

SCHWEIZER, M.; MATZENER, P.; PFAFFEN, G.; STALDER, H.; PETERHANS, E. “Self” and “Nonself” Manipulation of Interferon Defense during Persistent Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus Resists Alpha/Beta Interferon without Blocking Antiviral Activity against Unrelated Viruses Replicating in Its Host Cells. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 6926–6935, 15 jul. 2006.

SHIMIZU, T.; MATSUSAKA, E.; TAKAYANAGI, K.; MASUZAWA, T.; IWAMOTO, Y.; MORITA, T.; MIFUCHI, I.; YANAGIHARA, Y. Biological Activities of Lipopolysaccharide-Like Substance (LLS) Extracted from *Leptospira* interrogans Serovar canicola Strain Moulton. **Microbiology and Immunology**, v. 31, n. 8, p. 727–735, ago. 1987.

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, W. L. F.; FAGLIARI, J. J.; GIRIO, R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBA, M. R.; MATHIAS, L. A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 303–312, abr. 2012.

SILVA, L. F. da; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1471–1474, out. 2007.

SILVA, M. I. S.; MOTA, M. Â. O. A. R. A.; JUNIOR, J. W. P.; RABELO, S. S. D. A. Fatores de riscos associados à infecção poR *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 455–461, 2008.

SIMMONDS, P., BECHER, P., COLLET, M.S., GOULD, E.A., HEINZ, F.X., MEYERS, G., MONATH, T., PLETNEV, A., RICE, C.M., STIANSNY, K., THIEL, H.J., WEINER, A., BUKHET, J. Flaviviridae. In: **King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. [s.l: s.n.]p. 1003–1020.

SIQUEIRA, K. B.; CARNEIRO, A. V. Conjuntura do Mercado Lácteo. **Embrapa**, v. 44, p. 11, 2012.

SIX, A.; BANKS, M.; ENGELS, M.; BASCUÑANA, C. R.; 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, 1 jul. 2001.

SMITH, C.; KETTERER, P.; MCGOWAN, M.; CORNEY, B. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 9, p. 290–294, set. 1994.

SOUSA, M. E.; WAGNNER, J. N. P.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; SOUZA NETO, O. L.; FARIA, E. B.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Seroprevalence and risk factors associated with infection by *Neospora caninum* of dairy cattle in the state of Alagoas, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1009–1013, 2012.

SOUSA, V. E. de; BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. de M. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BOHV-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, v. 35, n. 1, p. 21–25, jun. 2013.

SPICKLER, A. R.; LEEDOM LARSON, K. **Leptospirosis**, 2013.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203, 28 fev. 2004.

TALAFHA, A. Q.; HIRCHE, S. M.; ABABNEH, M. M.; AL-MAJALI, A. M.; ABABNEH, M. M. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical animal health and production**, v. 41, n. 4, p. 499–506, 25 abr. 2009.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-Like Abortions in a Herd of Dairy Cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, n. 3, p. 205–209, jul. 1989.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 169–190, mar. 2006.

THURMOND, M. . Virus Transmission. In: **Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1º ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005. p. 91–104.

TONIN, A. A.; AZEVEDO, M. I. De; ESCOBAR, T. P.; CASASSOLA, I.; GASPARETO, L.; SCHAFER, A.; SILVA, D.; LUIS, J.; MARTINS, R.; SCHAEFER, C.; RENATO, M.; BADKE, T. Leptospirose bovina : aumento na incidência da *Leptospira* interogans sorovar Butembo no rebanho do estado de Santa Catarina , Brasil. **Microbiologia (Madrid)**, v. 4, n. 4, p. 294–297, 2010.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558–561, dez. 2005.

TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2004.

VALLE, P. .; MARTIN, S. .; TREMBLAY, R.; BATEMAN, K. Factors associated with being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the Møre and Romsdal County of Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3–4, p. 165–177, 11 jun. 1999.

VAN REENEN, C. .; MARS, M. .; LEUSHUIS, I. .; RIJSEWIJK, F. A. .; VAN OIRSCHOT, J. .; BLOKHUIS, H. . Social isolation may influence responsiveness to infection with bovine herpesvirus 1 in veal calves. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 135–143, jul. 2000.

VAN SCHAIK, G.; DIJKHUIZEN, A. A.; HUIRNE, R. B. M.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; HAGE, H. J. Risk factors for existence of Bovine Herpes Virus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 34, n. 2–3, p. 125–136, fev. 1998.

VIDOR, T. Isolamento e Identificação do vírus da doença das mucosas no Rio Grande do Sul. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 5, p. 51–58, 1974.

VIDOR, T.; HALFEN, D. C.; LEITE, T. E.; COSWIG, L. T. Herpes bovino tipo 1 (BHV 1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos**. Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 421-424,1995.

VIEIRA, R. J. Obstetrics in Cattle: from conception to puerperium. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. supl.2, p. 361–368, 2 jun. 2014.

VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1948–1951, 2006.

VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently, Experimentally Infected Calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512–4520, 1 out. 2003.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 881–883, out. 2002.

WEBER, M. N.; SILVEIRA, S.; MACHADO, G.; GROFF, F. H. S.; MÓSENA, A. C. S.; BUDASZEWSKI, R. F.; DUPONT, P. M.; CORBELLINI, L. G.; CANAL, C. W. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v. 191, n. 1, p. 117–124, out. 2014.

WESCHENFELDER, S.; NETO, J. A. P.; SCHMIDT, V. Levantamento sorológico e distribuição geográ fi ca da leptospirose em bovinos no Rio Grande do Sul , no período de 1999 a 2001. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 11, n. 1–2, p. 89–93, 2005.

WYNWOOD, S. J.; GRAHAM, G. C.; WEIER, S. L.; COLLET, T. A.; MCKAY, D. B.; CRAIG, S. B. Leptospirosis from water sources. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 7, p. 334–338, 27 out. 2014.

Anexos

Anexo 1

FORMULÁRIO PARA ENTREVISTA DE PRODUTORES

1. Propriedade nº:
2. Amostra_____ a _____
3. Nome do proprietário:
4. Animais a serem coletados:
5. Localidade:
6. Coordenadas:
7. Área de terra:
8. Número de fêmeas bovinas na propriedade:
9. Divisão por idade (meses): 13-24: 25-36: +36:
10. Machos: Inteiros: Castrados:
11. Número de fêmeas em lactação:
12. Produtividade de leite (média/vaca dia):
13. Regime de criação da propriedade? Extensivo ( ) Semi-intensivo ( ) Intensivo ( )
14. Possui sala de ordenha? SIM ( ) NÃO ( )
15. Mangueira SIM ( ) NÃO ( )
16. Silo para ração SIM ( ) NÃO ( )
17. Aluga pastos em alguma época do ano? SIM ( ) NÃO ( )
18. Tem pastos em comum com outras propriedades? SIM ( ) NÃO ( )
19. Existe na propriedade áreas alagadiças nas quais o gado tem contato? SIM ( ) NÃO ( )
20. Ocorrem enchentes na propriedade?
21. Tem piquete separado para fêmeas na fase do parto ou pós parto? SIM ( ) NÃO ( )
22. Existe apoio técnico? SIM ( ) NÃO ( )
23. Sem SIM, qual? ( ) zootecnista ( ) veterinário ( ) agrônomo ( ) outro .....
24. O proprietário recebeu algum treinamento? SIM ( ) NÃO ( )
25. Há quanto tempo tem criação de bovinos? ( ) menos de 1 ano ( ) de 1 a 3 anos ( ) mais de 5 anos

26. Número de bovinos/hectare:
27. Onde os animais dormem? CAMA ( ) PASTO ( ) ESTÁBULO ( )
28. Como é fornecida a alimentação? Canzil ( ) Cocho ( )
29. Os animais tem local fixo e predeterminado para se alimentar, ou seja, entram sempre na mesma baia? SIM ( ) NÃO ( )
30. Animais de categorias menores costumam comer os restos de alimentos das vacas no galpão? SIM ( ) NÃO ( )
31. É feito repasse da pastagem com categorias menores de fêmeas? SIM ( ) NÃO ( )
32. Fornece mineral? SIM ( ) NÃO ( )
33. Em cocho coletivo ( ) ou individual ( )
34. Considera ter problemas com fungos na silagem ou feno? SIM ( ) NÃO ( )
35. Utiliza adsorvente de micotoxinas? SIM ( ) NÃO ( )
36. Número de cães na propriedade:
37. Como os cães são mantidos? PRESOS ( ) SOLTOS( )
38. Qual o tipo de alimentação dado aos cães? COMIDA CASEIRA ( ) RAÇÃO ( )
39. Costuma dar restos de matança aos cães? SIM ( ) NÃO ( )
40. Tem açude na propriedade? SIM ( ) NÃO ( )
41. Os animais tem acesso ao açude? SIM ( ) NÃO ( )
42. Vermifugação: SIM ( ) NÃO ( )
43. Isolamento de animais doentes? SIM ( ) NÃO ( )
44. Higiene e antissepsia das instalações? SIM ( ) NÃO ( )
45. Outras espécies na propriedade: ( ) ovinos/caprinos ( ) equinos ( ) suínos ( ) aves ( ) cães ( ) gatos ( ) roedores
46. De onde vem a água que os animais bebem? POÇO ( ) FONTE ( ) CÓRREGO ( ) Outro:
47. Considera ter problemas com roedores? SIM ( ) NÃO ( )
48. Já avistou algum animal silvestre: ratão do banhado, raposa, quati, outros? SIM ( ) NÃO ( )
49. Utiliza algum método de controle de roedores? SIM ( ) NÃO ( ) QUAL?

50. Já houveram episódios de abortos na propriedade? SIM ( ) NÃO ( )
51. Esporadicamente ( ) Frequentemente ( )
52. Em qual fase gestacional eles mais ocorrem?
53. Foi percebida alguma relação entre avós, mães e filhas com histórico de aborto? SIM ( ) NÃO ( )
54. É feito confirmação de prenhes? SIM ( ) NÃO ( )
    Com quantos dias?
55. Há ocorrência de retorno ao cio? SIM ( ) NÃO ( )
56. Em média quantas inseminações são necessárias para se obter uma prenhes?
57. Qual o tipo de acasalamento? IA ( ) MONTA NATURAL ( )
58. Qual é o intervalo médio entre partos da propriedade?
59. O que faz com o feto abortado e a placenta?
    ( ) enterra/joga em fossa/queima ( ) alimenta cães/porcos ( ) nada
60. Compra fêmeas ou machos com a finalidade de reprodução?
    SIM ( ) NÃO ( )
61. Se SIM, de onde? ( ) em exposição ( ) em leilão/feira ( ) de comerciante de gado ( ) diretamente de outras fazendas
62. Vende fêmeas ou machos para reprodução? SIM ( ) NÃO ( )
63. Sincronização de cio: SIM ( ) NÃO ( )
64. Se SIM, a quem? ( ) em exposição ( ) em leilão/feira ( ) de comerciante de gado ( ) diretamente de outras fazendas
65. Já percebeu algum corrimento vaginal nos animais? SIM ( ) NÃO ( )
66. Já percebeu algum corrimento nasal nos animais? SIM ( ) NÃO ( )
67. Há ocorrência de conjuntivites nos animais? SIM ( ) NÃO ( )
68. Notou a presença de bezerras com atraso no crescimento e dificuldade no ganho de peso? SIM ( ) NÃO ( )
69. Há ocorrência de pneumonias frequentes em vacas e bezerras?
    SIM ( ) NÃO ( )
70. Alguma vez foi feito diagnóstico clínico de leptospirose na propriedade?
    SIM ( ) NÃO ( )
71. Já ocorreram casos de diarreia NÃO responsivos ao tratamento com ATB?
    SIM ( ) NÃO ( )
72. É realizado algum tipo de fomento reprodutivo na propriedade?
    SIM ( ) NÃO ( )

73. O veterinário costuma tocar todos os animais com a mesma luva?
    SIM ( ) NÃO ( )
74. Já utilizou ultrassom para confirmação de gestacão? SIM ( ) NÃO ( )
75. Já fez utilização de ultrassom para fins de diagnóstico? SIM ( ) NÃO ( )
76. Quais os principais problemas detectados?
    ( ) Cistos ( )Metrites ( )outros. Cite:
77. Costuma reutilizar agulhas e seringas? SIM ( ) NÃO ( )
78. Já fez algum exame sorológico no rebanho? SIM ( ) NÃO ( )
79. Para quais doenças?
80. Qual o foi o resultado?
    Leptospirose: ( )positivo ( )negativo
    IBR: ( )positivo ( )negativo
    BVD: ( )positivo ( )negativo
    Neospora: ( )positivo ( )negativo
    Outras. Cite:
81. Faz algum tipo de vacina no rebanho? SIM ( ) NÃO ( )
82. Se SIM preencha o quadro

VACINA	FREQUENCIA	ÚLTIMA DOSE

Anexo 2

FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL

1. Propriedade nº: Número de coletaº:
2. Proprietário:
3. Data da coleta:
4. Número do animal:
5. Data de nascimento: Idade do animal:
6. Raça:
7. Gestante: SIM ( ) NÃO ( ) Tempo:
8. Número de partos:
9. Intervalo entre partos:
10. Histórico de aborto: SIM ( ) NÃO ( ) Quantos?
11. Em que fase gestacional?
12. Há quanto tempo ocorreu o último aborto?
13. Número de Inseminações por gestação:
14. Tem parentesco com outro animal que tenha histórico de aborto?
    SIM ( ) NÃO ( )
15. Histórico de retorno ao cio: SIM ( ) NÃO ( )
16. Sinais Clínicos na data da coleta ( ) nenhum ( ) febre ( ) icterícia ( ) corrimento nasal ( ) conjuntivite ( ) corrimento vaginal ( ) diarreia ( )
17. Relacionar:
18. Vacinas Frequência Data da última vacinação

Anexo 3

UFPel
CEEA
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Pelotas, 14 de janeiro de 2016.

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Odir Antônio Dellagostin

Biotecnologia – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Senhor Professor:

A *CEEA* analisou as correções feitas o projeto intitulado: **"Investigação sorológica e validação de ELISA combinado para diagnóstico de Leptospirose, Neosporose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Diarréia Viral Bovina"** processo n°23110.007027/2015-76, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEA*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 7027-2015**).

Vigência do Projeto: 15/01/2016 a 01/04/2016

Espécie/Linhagem: Bovina/Leiteiras

Nº de animais: 410

Idade: ≥ 25 meses

Sexo: Fêmeas

Origem: Propriedades Leiteiras da Região Norte do Rio Grande do Sul

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Ciente em: _____/_____/2016

Assinatura do Professor Responsável: _____