

Paulo Artur Konrad

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DE AGENTES INFECCIOSOS QUE AFETAM A
REPRODUÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS EM MINAS GERAIS, 2001-2002.**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção de grau de Mestrado
em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Medicina Veterinária
Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2003

K82i Konrad, Paulo Artur, 1967-
Inquérito sorológico de agentes infecciosos que afetam a reprodução
de bovinos leiteiros em Minas Gerais, 2001-2002 / Paulo Artur Konrad.-2003.

40p. il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite

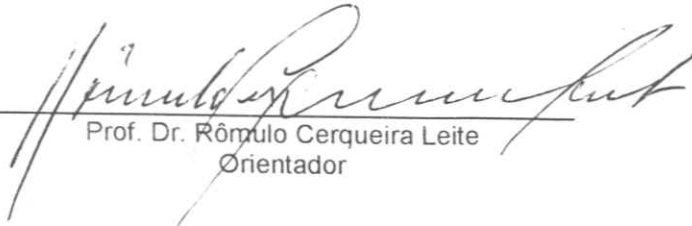
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola
de Veterinária

Bibliografia: p.


1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Bovino de leite – Reprodução -
Teses. 3. Aborto nos animais – Teses. 4. Doenças infecciosas em animais –
Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira Leite. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título

CDD – 636.214 089 69

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2003 pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite
Orientador



Dr. Ademir de Moraes Ferreira



Profa. Dra. Angela Maria Quintão Lana



Prof. Dr. Elvio Carlos Moreira



Prof. Dr. Maurílio Andrade Rocha

*Dedico este trabalho:
A Deus, pois ele é a razão do meu existir,
A meus pais, meus irmãos e minha noiva que sempre me apoiaram e incentivaram,
Aos meus amigos Antônio Cândido e Geder Paulo pela ajuda prestada,
Ao professor Rômulo pela orientação, amizade, experiência e dedicação.*

REVERÊNCIA AO DESTINO

Falar é completamente fácil, quando se têm palavras em mente que expressem sua opinião.
Difícil é expressar por gestos e atitudes o que realmente queremos dizer, o quanto queremos dizer, antes que a pessoa se vá.
Fácil é julgar pessoas que estão sendo expostas pelas circunstâncias.
Difícil é encontrar e refletir sobre os seus erros, ou tentar fazer diferente algo que já fez muito errado.
Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir.
Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz.
Fácil é analisar a situação alheia e poder aconselhar sobre esta situação.
Difícil é vivenciar esta situação e saber o que fazer, ou ter coragem para fazer.
Fácil é demonstrar raiva e impaciência quando algo o deixa irritado.
Difícil é expressar o seu amor a alguém que realmente te conhece, te respeita e te entende. E é assim que perdemos pessoas especiais.
Fácil é mentir aos quatro ventos o que tentamos camuflar.
Difícil é mentir para o nosso coração.
Fácil é ver o que queremos enxergar.
Difícil é saber que nos iludimos com o que achávamos ter visto. Admitir que nos deixamos levar, mais uma vez, isso é difícil.
Fácil é dizer "oi" ou "como vai"?.
Difícil é dizer "adeus". Principalmente quando somos culpados pela partida de alguém de nossas vidas.
Fácil é abraçar, apertar as mãos, beijar de olhos fechados.
Difícil é sentir a energia que é transmitida. Aquela que toma conta do corpo como uma corrente elétrica quando tocamos a pessoa certa.
Fácil é querer ser amado.
Difícil é amar completamente só, amar de verdade, sem ter medo de viver, sem ter medo do depois. Amar e se entregar. E aprender a dar valor somente a quem te ama.
Fácil é ouvir a música que toca.
Difícil é ouvir a sua consciência acenando o tempo todo, mostrando nossas escolhas erradas.
Fácil é ditar regras.
Difícil é segui-las. Ter a noção exata de nossas próprias vidas, ao invés de ter noção das vidas dos outros.
Fácil é perguntar o que deseja saber.
Difícil é estar preparado para escutar esta resposta. Ou querer entender a resposta.
Fácil é chorar ou sorrir quando der vontade.
Difícil é sorrir com vontade de chorar ou chorar de rir, de alegria.
Fácil é dar um beijo.
Difícil é entregar a alma. Sinceramente, por inteiro.
Fácil é sair com várias pessoas ao longo da vida.
Difícil é entender que pouquíssimas delas vão te aceitar como você é e te fazer feliz por inteiro.
Fácil é ocupar um lugar na caderneta telefônica.
Difícil é ocupar o coração de alguém. Saber que se é realmente amado.
Fácil é sonhar todas as noites.
Difícil é lutar por um sonho.
Eterno é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se eterniza, e nenhuma força jamais o resgata.

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha existência, e por ter me proporcionado os meios e ter colocado em meu caminho pessoas necessárias para a realização deste trabalho.

A meus pais pela formação recebida e apoio em todos os momentos de minha vida.

A meus queridos irmãos pela compreensão, paciência e ajuda financeira.

A minha companheira, compreensiva e dedicada noiva, pelo incentivo e afeto demonstrado, mesmo à distância.

Ao meu amigo Antônio Cândido de Cerqueira Leite Ribeiro, por me encaminhar e incentivar a enfrentar este desafio.

Ao meu sábio mestre orientador Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite, que me amparou em todos os momentos da realização deste trabalho, orientando-me com dedicação, paciência, compreensão, companheirismo e responsabilidade.

Ao prof. Dr. Élvio Carlos Moreira, que me acolheu com carinho e companheirismo em seu laboratório, e que sempre esteve disposto a me ajudar nos momentos que mais precisei.

Ao colega e amigo Gustavo Fontes por ter me ajudado nas coletas e no processamento das amostras de sangue.

Aos funcionários, Toninho, Jorge, Júnia, Nádia, Eduardo, pelo carinho e disposição em ajudar e em especial a minha amiga Ângela, por ter me acompanhado com paciência e disposição, bem como me orientado e ensinado no início dos trabalhos.

Aos professores Romário, Andrey, Maurílio, Zélia, Último, Marc Henry, Celina, Elias (Lobão), Paulo Marcos, Élvio, Rômulo, Francisco e outros que acompanharam toda minha caminhada para atingir esse meu objetivo e em especial ao professor Ivan Sampaio e à professora Ângela Maria, pela ajuda prestada na parte estatística do trabalho.

Aos meus eternos amigos, Geder, Daniel, Ricardo, Rogério e Juliano, com os quais dividi muitas alegrias e tristezas durante o curso. Obrigado pela acolhida, apoio e incentivo nos momentos de desânimo.

À Escola de Veterinária da UFMG, exemplo de Instituição Acadêmica que proporcionou a realização de meu tão almejado curso de pós-graduação.

E finalmente, àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que mereciam serem citados. De coração, meu muito obrigado.

Sei que terei sido injusto com alguns, por esquecer nomes, fatos e datas. Perdoem-me.

SUMÁRIO

		Pág.
	LISTA DE ABREVIATURAS	10
	RESUMO	11
	ABSTRACT	12
1	INTRODUÇÃO	13
2	LITERATURA CONSULTADA	14
2.1	Eficiência Reprodutiva	14
2.2	Brucelose	14
2.3	Leptospiroses.....	15
2.4	Rinotraqueite infecciosa bovina.....	16
2.5	Diarréia viral bovina	17
2.6	Língua azul.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Localização geográfica	19
3.2	Propriedades.....	20
3.3	Animais	20
3.4	Dados reprodutivos.....	21
3.5	Coleta e processamento das amostras	21
3.6	Microtécnicas utilizadas	21
3.6.1	Microtécnica de soroneutralização	21
3.6.2	Prova do antígeno acidificado tamponado e 2-mercaptoetanol	22
3.6.3	Reação de soroaglutinação microscópica	22
3.6.4	Técnica de imunodifusão em gel de agarose (IDGA).....	22
3.7	Análise estatística	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Freqüência de bovinos soropositivos para brucelose, língua azul, IBR, DVB e leptospiroses.	23
4.1.1	Língua azul.....	24
4.1.2	Diarréia viral bovina	25
4.1.3	Rinotraqueite infecciosa bovina.....	26
4.1.4	Leptospiroses.....	28
4.1.5	Brucelose	29
4.2	Associação entre sorologia para língua azul, IBR, DVB e leptospiroses, com problemas de aborto e repetições de cio.....	30
5	CONCLUSÕES	35
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Freqüência de animais positivos para as enfermidades estudadas nos 1304 bovinos oriundos de 15 rebanhos leiteiros em Minas Gerais, 2001-2002.	23
Tabela 2	Freqüência de animais soropositivos para língua azul detectados pelo teste de imunodifusão em gel de ágar, em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.....	24
Tabela 3	Freqüência de animais soropositivos para diarréia viral bovina, detectados pelo teste de soroneutralização, em 15 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.	26

Tabela 4	Freqüência de animais soropositivos para rinotraqueíte infecciosa bovina detectados pelo teste de soroneutralização, em 15 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.....	27
Tabela 5	Freqüência de animais soropositivos para leptospiroses detectados pelo teste de aglutinação microscópica em 15 propriedades de rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.....	28
Tabela 6	Freqüência de animais soropositivos para brucelose detectados pelo teste do antígeno acidificado tamponado e confirmados pelo 2-mercaptoetanol em 15 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.....	30
Tabela 7	Freqüência observada nos grupos de animais com ou sem aborto encontradas na sorologia e significância das análises estatísticas, em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.	31
Tabela 8	Freqüência sorológica para as enfermidades estudadas, associando-as com os abortos ocorridos em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.	31
Tabela 9	Freqüência observada nos grupos de animais com ou sem repetição de cio encontradas na sorologia e significância das análises estatísticas, em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição dos municípios de Minas Gerais cujos rebanhos participaram do estudo em 2001-2002.....	20
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

χ^2 : Teste de Qui-Quadrado
μ L: Microlitro
ATCC: American Type Culture Collection
CO ₂ : Gás carbônico
CP: Citopatogênicas
DMVP-EV (UFMG): Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
DVB: Diarréia viral bovina
ECP: Efeito citopático
EUA: Estados Unidos da América
FA: Febre Aftosa
HVB-1: Herpes vírus bovino tipo 1
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina
IDGA: Imunodifusão em gel de Ágar
km ² : Quilômetros quadrados
LA: Língua Azul
LEP: Leptospiroses
MARA: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária do Governo Brasileiro
MDBK: Madin-Dairy Bovine kidney
MEM: Meio essencial mínimo
NADL: Cepa padrão DVB originária de: National Animal Disease Laboratory, Iowa, 1962.
NCP: Não citopatogênicas
OIE: Office International Epizooties (<i>Escritório Internacional de Epizootias</i>)
PI: Persistentemente infectados
TCID ₅₀ /mL: Dose infectante em cultura de tecido
VDVB: Vírus da diarréia viral bovina
VLA: Vírus da Língua Azul

RESUMO

Com o objetivo de determinar as causas infecciosas que afetam a reprodução de bovinos em Minas Gerais, para possível associação com relatos de abortos e repetições de cio ocorridos no período de 2001-2002, realizou-se um levantamento soroepidemiológico em 15 propriedades leiteiras localizadas em várias regiões do Estado, cujos rebanhos apresentavam problemas reprodutivos. Pesquisaram-se anticorpos para brucelose, leptospiroses, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina, (DVB) e língua azul em 1304 amostras de soros de fêmeas bovinas, com ou sem problemas reprodutivos. Os resultados mostraram presença de anticorpos para os seguintes agentes e respectivas percentagens: sete animais positivos para brucelose (0,54%); 284 para *Leptospira sp.* (21,78%); 776 para LA (59,51%); 380 para IBR (29,14%) e 425 para DVB (32,59%). Verificou-se que os agentes estão amplamente disseminados nos rebanhos e a associação dos resultados sorológicos com relatos de abortos demonstrou que os animais com sorologia positiva para mais de uma enfermidade apresentaram maior número de abortos, em relação aos animais com sorologia negativa, sugerindo a participação dessas doenças infecciosas nos problemas reprodutivos. Não se observou associação entre os resultados sorológicos e as repetições de cios entre os grupos.

Palavras chave: bovinos, reprodução, doença, aborto.

ABSTRACT

With the objective to determine the infectious causes that affect reproduction in cattle in the State of Minas Gerais, Brazil, for possible association with history of abortion and estrus repetition that occurred during the years of 2001-2002. a seroepidemiological survey was realized in 15 properties of dairy production, located in different regions of the State, with report of reproductive problems. Antibodies Against Brucellosis, Leptospiroses, Infectious Bovine Rinotracheitis (IBR), Bovine Viral Diarrhea (DVB) and Blue Tongue were researched in 1304 serums samples of bovine females, with or without reproductive problems. The results demonstrate the presence of antibodies to the following agents and there respective percentages: seven animals positive for brucellosis (0,53%); *Leptospira sp.* 284 (21,78%); Blue tongue 776 (59,51%); IBR 380 (29,14%) and DVB 425 (32,55%). It was verified that these agents are wide spread in the herds and the correlation of the serological results with the abortion cases demonstrated that animals with positive serology for more than one disease presented higher number of abortions, when compared with the ones with negative serology, suggesting the participation of these infectious diseases in the related reproductive problem. No association between the serological results and estrus repetition between the groups was observed.

Key words: bovine, reproduction, diseases, abortion.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite no Brasil constitui uma atividade pecuária tradicional, desde o início da colonização. Assume grande importância não só por ser fonte de alimento nobre para a população, mas também por auxiliar na permanência do produtor rural no campo. Trata-se de um segmento do agro-negócio gerador de empregos e responsável pela movimentação de milhões de reais na economia do País.

O número de vacas em lactação no Brasil, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)- Pesquisa da Pecuária Municipal (Instituto..., 2001) é de 18.193.951 animais, distribuídos em cinco regiões geográficas, com maior concentração na Região Sudeste, responsável pela manutenção de 38,01 % da população bovina. Nesta região destaca-se o Estado de Minas Gerais, historicamente o que mais produz leite no País e que na última década apresentou taxa de crescimento da produção inferior à de outros Estados, mas ainda assim permaneceu como o maior produtor de leite do País, com 4.474.638 vacas ordenhadas e produção de 5.981.223.000 litros durante o ano de 2001 (Instituto..., 2001).

Nos últimos anos ocorreram mudanças acentuadas na organização estrutural da atividade leiteira, bem como a implantação de tecnologias capazes de mudar notadamente o perfil do produtor de leite. A intensificação da pecuária tem sido uma prática cada vez mais adotada para a produção competitiva de alimentos. A produtividade aumentou em razão de modificações significativas no manejo, alterando por completo o comportamento, a ambiência e a rotina de trabalho nos criatórios. Paralelamente a esses avanços, surgiram fatores que limitaram o crescimento e a expansão do setor, citando-se entre eles a ocorrência de enfermidades infecciosas.

A preservação da sanidade dos rebanhos está intimamente associada à identificação rápida e precisa das doenças para que as medidas de controle possam ser imediatamente adotadas. Estudos soropidemiológicos com detecção de anticorpos são indicadores de imunidade

aos agentes que causam transtornos à sanidade, e a percentagem de animais sorologicamente positivos determina a situação epidemiológica de rebanho ou da região fisiográfica, determinando situação de estabilidade ou instabilidade enzoótica. Por isso, o levantamento sorológico deve ser uma meta contínua das propriedades, e será tanto mais eficiente quanto mais constante forem os exames realizados. A sanidade associada à alimentação, constituem a base para qualquer programa de produção animal, e medidas de caráter profilático devem sempre prevalecer às de ordem terapêutica.

Dentre as várias enfermidades bovinas que merecem ênfase por afetarem o desenvolvimento pecuário estão aquelas relacionadas com a reprodução. Elas podem ser de origem virótica, como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a diarreia viral bovina (DVB) e a língua azul (LA), ou de origem bacteriana, como a brucelose e as leptospiroses. Vários outros agentes infecciosos oportunistas, como os *Streptococcus*, os *Staphylococcus* e as Enterobactérias podem ser incluídos nessa relação.

As doenças relacionadas com a reprodução, apesar de já terem sido diagnosticadas há muito tempo, e de muitos esforços terem sido emvidados visando o seu controle e erradicação, ainda constituem problemas sanitários de relevante importância para os rebanhos bovinos. Elas acarretam custos adicionais pelo uso de medicamentos e de mão-de-obra especializada, e pelo menor progresso genético devido ao descarte obrigatório ou morte de animais, afetando de forma acentuada os níveis produtivos do país.

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um estudo sobre a presença de anticorpos para agentes infecciosos em soro sanguíneo de bovinos leiteiros de propriedades de Minas Gerais, cujos rebanhos apresentavam problemas reprodutivos, e estudar a associação dos resultados da sorologia com ocorrência de abortos e repetições de cio verificados nas propriedades no período de 2001-2002.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Eficiência Reprodutiva

O bom desempenho reprodutivo do rebanho constitui um dos principais fatores de sucesso na bovinocultura leiteira, por propiciar aumento na produção de leite, maior número de partos/ano, conseqüentemente maior número de crias que podem ser aproveitadas no plantel ou comercializadas (Fernandes, 2001).

São muitas as condições que interferem na eficiência e na vida reprodutiva dos bovinos e entre eles citam-se as causadas pelas doenças infecciosas. Por exemplo, o estabelecimento de uma nova gestação depende do reinício da atividade ovariana pós-parto (Ferreira, 1991), além de um ambiente uterino apropriado para receber o novo produto da concepção (Loeffler et al., 1999).

A infertilidade e os abortos em bovinos de leite são dois problemas enfrentados nas explorações modernas e suas causas são de difícil identificação por serem multifatoriais e complexas. Resultados mostram que determinar suas causas é difícil e que apenas 25 a 30 % dos abortos podem ser diagnosticados (Dubey et al., 1992; Guitián et al., 1999). Isso deve-se ao fato de a morte do feto ocorrer semanas ou até meses antes do aborto e, com isso, na hora da expulsão o agente não ser mais detectável, acrescentando-se que as alterações pós-morte do feto podem encobrir as verdadeiras lesões. A demora em detectar o aborto e o tipo, a maneira e as condições de envio do material abortivo ao laboratório podem agravar o problema. Isso faz com que as causas de abortos continuem sendo pouco conhecidas. Em geral, segundo Aduriz et al. (2001), as causas infecciosas continuam sendo as mais diagnosticadas (90%), devido à maior disponibilidade de técnicas para sua identificação.

Um levantamento da situação dos rebanhos através do diagnóstico sorológico pode ajudar em parte a identificar as prováveis causas de transtornos reprodutivos. Porém,

os resultados são de difícil interpretação, até mesmo quando são pareados, levando a conclusões errôneas. Essa interpretação pode ser dificultada pela possibilidade de os anticorpos serem de origem vacinal ou induzidos por infecções anteriores (Guitián et al., 1999).

É importante que o desempenho reprodutivo seja periodicamente avaliado quando se pretende maximizar a fertilidade sob certas condições de ambiente e de manejo. Os índices reprodutivos são valiosas ferramentas para essa avaliação e quanto mais completas e acuradas forem as informações disponíveis na propriedade, maior o número de índices que poderão ser calculados e interpretados (Fernandes, 2001).

Dentre os fatores climáticos, o estresse calórico constitui o principal fator de diminuição da fertilidade, ao provocar alterações metabólicas, endócrinas e do meio uterino, trazendo como conseqüência redução da taxa de fecundação ou aumento da mortalidade embrionária. O estresse calórico pode afetar o processo de capacitação espermática, o transporte e a qualidade do ovócito e, conseqüentemente, a fertilização, além de prejudicar o desenvolvimento embrionário e aumentar o número de embriões degenerados, os quais apresentam menor capacidade de produzir o complexo de proteínas responsáveis pelo reconhecimento materno da gestação. Acrescente-se ainda a baixa imunológica que ocorre nos animais, deixando-os susceptíveis às doenças infecciosas (Bowman, 2002).

2.2 Brucelose

A brucelose dos bovinos é uma doença infecciosa causada pela *Brucella abortus*, caracterizada por cocobacilos gram-negativo, imóveis e aeróbicos, que exigem meios de cultura enriquecidos para seu isolamento inicial. A enfermidade, por sua cronicidade, provoca perdas econômicas significativas, dificultando o desenvolvimento da pecuária e prejudicando o comércio de animais e de produtos derivados (Almeida, Reis, 1999).

Os efeitos da doença sobre os rebanhos são comprovadamente severos, manifestando-se por aborto, retenção de placenta, metrites, orquites em machos, subfertilidade e até infertilidade. A percentagem de animais que abortam depende do número de fêmeas em gestação e do estágio da gestação na época de introdução da doença. Apenas um animal contaminado é o suficiente para disseminar o agente para todos os animais susceptíveis (Poester, 1997).

O último diagnóstico da situação da brucelose em âmbito nacional foi realizado em 1975. As percentagens estimadas de animais positivos foram: 4,0% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte. Posteriormente foram realizados outros levantamentos sorológicos por amostragem em alguns estados, os quais revelaram pequenas alterações na prevalência da brucelose. No Rio Grande do Sul passou de 2,0% em 1975 para 0,3% em 1986; em Santa Catarina de 0,2% em 1975 para 0,6 em 1996; no Mato Grosso do Sul foi de 6,3% em 1998, a mesma já encontrada em 1975; em Minas Gerais passou de 7,6% em 1975 para 6,7% em 1980; no Paraná, de 9,6% em 1975 para 4,6% em 1989. Os dados de notificações oficiais indicam que a prevalência de animais soropositivos manteve-se entre 4% e 5% no período de 1988 a 1998 (Ministério..., 2001).

Algumas vacas infectadas com histórico de aborto anterior eliminam *brucelas* a partir do útero nos partos normais subseqüentes. As infecções secundárias contribuem para a infertilidade e podem prolongar o período de involução uterina e de presença de *Brucella abortus* no útero e em suas descargas (Fraser, 1996).

As formas de controle e erradicação da brucelose em bovinos baseiam-se principalmente na vacinação de bezerras de três a oito meses de idade com a amostra viva B19 de *Brucella abortus*, no monitoramento de rebanhos pelo "ring test", na detecção de rebanhos infectados no abate e conseqüente rastreamento do

rebanho de origem dos animais positivos, e na identificação de animais infectados por meio de testes sorológicos e/ou exames bacteriológicos em tecidos apropriado ou leite (Thoen, Cheville, 1995) e sua eliminação.

2.3 Leptospiroses

Nos bovinos as leptospiroses constituem as mais importantes causas de falhas reprodutivas. São zoonoses de dimensão mundial, responsáveis por sérias perdas econômicas tais como: diminuição na produção de leite, aumento do intervalo de partos, ocorrência de abortos, natimortalidade, nascimento de animais debilitados e infertilidade (Dhaliwal et al., 1996). As enfermidades afetam várias espécies de animais domésticos e silvestres, que adquirem naturalmente a infecção podem funcionar como portadores ou reservatórios. No entanto um pequeno número de animais adquire a doença (Ellis, 1994). A transmissão se dá por contato direto com a urina, sangue ou tecidos de animais infectados, ou de modo indireto pela água, solos úmidos contaminados, alimentos contaminados ou até mesmo por fômites. As vias de penetração nos animais susceptíveis são: pele lesada e mucosas oral, nasal, ocular e genital (Juliano et al., 2000).

O gênero *Leptospira* sp, família *Leptospiraceae*, recentemente foi classificado por estudos de afinidades antigênicas e análises moleculares, e os agentes etiológicos das leptospiroses foram divididos em duas espécies, patogênica e não patogênicas.

No Brasil os inquéritos sorológicos realizados em bovinos até o ano de 1980 acusavam índices de animais reagentes positivos para as leptospiroses de 15% a 18%, com predomínio de reações para a variante sorológica *wolffi*. No entanto, investigações mais recentes mostraram que, nos últimos anos, essa situação apresentou sensível modificação, com elevação nos índices de animais sororeagentes para 20 a 70% e predomínio de reações para a variante sorológica *hardjo* (Brod et al., 1994;

Lilenbaum e Santos, 1995; Vasconcellos et al., 1996; Vasconcellos, 1997; Herrmann, 2002). A infecção por esse sorovar parece ter efeito direto sobre a fertilização, ao interferir na função do corpo lúteo através da diminuição dos níveis de progesterona (Dhaliwal et al., 1996). Segundo Tedesco (1997), as leptospiroses em bovinos são doenças ainda em expansão no País.

Leptospiroses são doenças com variedade muito grande de sorotipos. Nos bovinos as pesquisas indicam que o sorotipo *hardjo* é o mais freqüentemente detectado e o que causa maior impacto econômico, ao afetar a função reprodutiva de rebanhos de bovinos no Brasil e em diversas partes do mundo (Miller et al., 1991; Ellis, 1994; Moreira, 1994; Tedesco, 1997). Um fator que comprova a presença desse sorotipo é o grande número de vacas com mamite sanguinolenta, sem reação inflamatória e com flacidez da glândula mamária, a qual constitui o quadro típico da infecção por essa sorovariedade (Leite, 2000). Outros sorotipos de *Leptospira* nos rebanhos bovinos, como *pomona*, já considerado de maior importância para bovinos (Moreira, 1994), também podem causar grandes prejuízos ao serem responsáveis por surtos de abortos (Leite, 2000).

A erradicação das leptospiroses é impraticável, no entanto, pode-se manter as doenças sob controle por meio de vacinações, usando-se vacinas de boa qualidade, aplicadas em intervalos regulares. É de extrema importância conhecer as sorovariedades presentes na região para se fazer a vacinação específica. O tratamento com antibiótico (dihidroestreptomicina) é eficaz, mas muito oneroso, sendo restrito para animais com sintomatologia clínica e de grande valor zootécnico.

2.4 Rinotraqueíte infecciosa bovina

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) é uma infecção herpética dos bovinos. É de fácil transmissão e conhecida principalmente como enfermidade dos tratos respiratório e reprodutivo. Descrita pela primeira vez nos Estados Unidos por Miller

(1955), ela é causada pelo herpesvírus bovino 1 (HVB-1), pertencente à família *Herpesviridae*, gênero *Varicellovirus* e subfamília *Alphaherpesvirinae*. A doença, de distribuição mundial, é economicamente muito importante. O vírus pode permanecer em estado de latência, alojando-se nos gânglios nervosos, principalmente no trigêmeo e sacro, e ser reativado em situações estressantes ou nos tratamentos prolongados com corticóides (Lobato, 2000).

Dados sobre a ocorrência e prevalência do HVB-1 demonstram que o agente está disseminado nos rebanhos brasileiros (Pituco, 1988; Vidor et al., 1995). O primeiro relato do HVB-1 no Brasil foi feito por Galvão et al. (1963) na Bahia, através de um levantamento sorológico feito em animais adultos, cuja positividade foi de 35%. Alice (1978), também na Bahia, realizou o primeiro isolamento do vírus no país, no exame de raspado de pústulas vaginais de vacas. As freqüências de animais e de rebanhos soropositivos indicam que no Brasil a infecção pelo HVB-1 apresenta caráter endêmico, tanto em plantéis destinados à produção de leite como à de carne.

Em Minas Gerais, Castro (1988), ao estudar doenças que afetam a reprodução animal, em um programa de transferência de embriões, encontrou 44% de doadoras e 54% de receptoras reagentes ao HVB-1. Em levantamento realizado por Melo et al. (1998) em rebanhos leiteiros e de corte no Estado da Paraíba foram encontrados anticorpos neutralizantes para HVB-1 em 62,68% das amostras analisadas, e em todos os rebanhos estudados. Melo (1998) fez um estudo em 26 rebanhos de corte e de leite no Estado de Minas Gerais e verificou que a doença está amplamente distribuída no Estado, principalmente nos animais em produção, nos quais a incidência foi superior a 40%.

A infecção pelo HVB-1 pode provocar danos diretamente no útero e nos ovários, bem como no embrião ou feto, determinando falhas reprodutivas. O vírus pode atingir essas estruturas por viremia ou pela

deposição direta através de sêmen contaminado (Miller, 1991; Lobato, 2000).

O HVB-1 pode comprometer o desenvolvimento do embrião e do feto em qualquer período, podendo causar aborto em qualquer fase da gestação (Canant, 1984 e 1985; Kirkbride, 1985). Três a seis semanas após a infecção, aproximadamente 30% das fêmeas gestantes podem abortar. Por ser mais fácil a observação, tem-se registrado a maior frequência de abortos entre o segundo e o terceiro trimestre de gestação. O HVB-1 pode provocar a morte do embrião logo após a perda de sua proteção pela zona pelúcida. Isso ocorre a partir do sétimo dia pós-fertilização, quando ele torna-se susceptível ao vírus que o mata pela atividade citotóxica nas células embrionárias, ou por alterações fisiopatológicas do ambiente uterino, que são incompatíveis com o desenvolvimento normal do embrião (Miller, Van Der Martin, 1986).

Fetos abortados por causa do HVB-1 não apresentam lesões patognomônicas à necrópsia, porém algumas alterações macroscópicas, por sua maior frequência, são sugestivas. Além de hemorragia generalizada, que também pode ocorrer em infecções causadas por outros microrganismos, as alterações mais significativas são encontradas no fígado e nos rins. O fígado pode apresentar superfície amarelada, consistência elástica e com pequenos pontos esbranquiçados, caracterizando áreas de necrose. Os rins e a gordura perirrenal podem estar envolvidas por edema hemorrágico com grande destruição do córtex renal, permanecendo apenas uma fina camada aderida à cápsula. A medula renal também pode apresentar-se totalmente destruída, encontrando-se, em muitas ocasiões, somente debris celulares imersos em um líquido vermelho escuro (Canant, 1984, e 1985).

O diagnóstico da infecção por HVB-1 deve ser realizado com base nos achados clínicos, patológicos e epidemiológicos. Porém, para se fazer o diagnóstico definitivo da doença é necessário o exame de

laboratório. A presença do vírus pode ser demonstrada de forma direta por meio de isolamento, de técnicas de imunodiagnóstico em tecido suspeito ou de comprovação da presença de seu ácido nucléico nas amostras suspeitas, ou de forma indireta por meio de testes sorológicos. As amostras devem ser coletadas de acordo com a forma da doença (Lobato, 2000).

O controle deve combinar manejo correto, vacinação e não introdução de animais positivos em rebanhos declaradamente negativos. Em rebanhos de prevalência desconhecida ou alta, como é o caso do Brasil, a recomendação é vacinar novilhas após seis meses de idade e revaciná-las antes da cobrição ou aos 18 meses. A vacinação não confere imunidade total e duradoura, mas minimiza a sintomatologia clínica, evitando prejuízos (Leite, 1999)

2.5 Diarréia viral bovina

Diarréia viral bovina (DVB) é uma doença causada por um vírus do gênero *Pestivirus*, da família *Flaviviridae*. Ele é um dos patógenos de bovinos mais comuns em todo o mundo. Está associado a múltiplas manifestações clínicas, incluindo problemas gastroentéricos ou respiratórios, diarréia hemorrágica, perdas reprodutivas atribuídas à infertilidade temporária, mortalidade embrionária, abortamento ou mumificação do feto, malformações, natimortalidade ou nascimento de bezerros fracos e inviáveis (Flores, 2000). A forma subclínica da doença também pode ocorrer e mesmo que a vaca infectada não esteja clinicamente doente, o feto pode ser severamente afetado.

Há dois biotipos do vírus da diarréia viral bovina (VDVB), as amostras citopatogênicas (CP) e as não citopatogênicas (NCP), caracterizadas pela presença ou não de efeito citopatogênico em cultivos celulares (Bolin, 1995; Backer, 1987). A virulência do vírus depende do biotipo, das variações existentes entre as cepas e da via de exposição do animal (Bolin, 1995). No período de diarréia aguda provocada pela enfermidade, as células linfóides são

depletadas e o sistema imune fica com sua função suprimida, com conseqüente aumento da suscetibilidade a outras infecções (Durham, Howard, 1990).

O VDVB divide com outros *Pestivirus* a habilidade de atravessar a placenta de animais hospedeiros prenhes. Os efeitos de infecções fetais são complexos e dependem de uma série de fatores, como por exemplo, a idade do feto e a propriedade do vírus (Moening, Liess, 1995). Quando amostras NCP infectam a fêmea gestante soronegativa, após a viremia, o vírus atinge o placentoma e o feto contudo, na maioria dos casos, não se detectam sinais clínicos da DVB. As conseqüências desta infecção dependem da idade do feto. Se for inferior a 30 dias a taxa de concepção se reduz. Acredita-se que o vírus possa interferir com a fertilização ou afetar a viabilidade do embrião no período de pré-implantação. Em geral fêmeas infectadas nessa fase inicial de gestação apresentam problemas de infertilidade transitória, voltando a conceber normalmente após um ou dois episódios de repetição de cio. Se o vírus atingir fetos com 50 a 100 dias de idade, os resultados podem ser aborto, mumificação fetal ou natimortalidade. Se for no período de 100 a 150 dias da gestação, podem-se observar nascimentos de animais com defeitos congênitos, principalmente os relacionados com o sistema nervoso central, pois esse período coincide com os estádios finais da organogênese desse sistema. Infecções de 40 a 120 dias de gestação levam ao estabelecimento da imunotolerância, que dará origem a animais persistentemente infectados (PI). Fetos com mais de 150 dias de idade já são imunocompetentes, por isso, se infectados nesse período, nascem normais porém soropositivos para VDBV (Lobato, 2000).

Estudos demonstram prevalência aproximada de 0,5 a 2,0% de animais PI e de 60-85% de animais soropositivos (Braun et al., 1997; Barbosa, 1999). No Brasil, o VDBV foi isolado pela primeira vez por Vidor (1974), a partir de soro bovino proveniente de animais de abatedouro. Levantamentos sorológicos regionais demonstraram que a prevalência é alta em todas as regiões do

país (Lemos, 1998), e que o vírus é endêmico na América do Sul (Rweyemamu et al., 1990). O diagnóstico da DVB deve ser feito com base nos achados clínicos e epidemiológicos do rebanho, porém testes de laboratório são essenciais para a sua confirmação. A identificação e a remoção de animais PI do rebanho é medida essencial no controle da DVB.

A DVB esta altamente distribuída na população adulta de bovinos e sua erradicação está fora de cogitação. No entanto, o controle da doença é possível e o melhor meio é a vacinação das novilhas após seis meses de idade e a revacinação antes da cobrição ou aos 18 meses (Leite, 1999). Isso se justifica por ser a faixa etária com maior número de animais não-infectados que, ao serem incorporados ao rebanho já contaminado, terão níveis de anticorpos suficientes para se tornarem resistentes a ponto de não apresentarem quadro clínico.

2.6 Língua azul

A língua azul (LA) é uma enfermidade infecciosa, não contagiosa, causada pelo vírus da língua azul, protótipo do gênero *Orbivirus*, família *Reoviridae*. Provavelmente todas as espécies ruminantes são suscetíveis, entretanto a doença clínica tem sido verificada principalmente em ovinos. Até hoje 24 sorotipos do vírus foram relatados em vários países de áreas tropicais e subtropicais. O limite de latitude de sua distribuição, segundo Cunha (2000), estaria entre 40°N e 28,67°S. A doença é transmitida por mosquitos do gênero *Culicoides* e se caracteriza por congestão das mucosas nasal e bucal e do tecido da coroa do casco, degeneração muscular e anomalias congênitas em fetos de fêmeas infectadas durante a gestação (Lobato, 1999).

O vírus atinge o hospedeiro bovino por via sangüínea, tem tropismo por hemácias e células epiteliais. Os anticorpos permanecem no sangue durante vários anos (Pearson, Jochim, 1979). Nos animais adultos geralmente não causam maiores danos à saúde porém, em certas ocasiões, são observadas lesões ulcerativas nas

mucosas e na pele, possivelmente em decorrência de reação de hipersensibilidade. A infecção congênita ocorre por via transplacentária e o tempo de gestação determina a possível evolução das lesões. Quando ela ocorre durante a organogênese, podem se observar malformações congênitas, mortalidade fetal, aborto ou reabsorção (Osburn, 1985).

Os bovinos, na maioria das vezes, não apresentam sintomatologia clínica. Perda de peso e queda na produção de leite podem ser observadas. Distúrbios reprodutivos e malformações congênitas estão entre as mais comuns, além de afecções na boca, casco e tetas. Os sintomas podem ser facilmente confundidos com os de outras doenças, como IBR, DVB, febre aftosa (FA), estomatite vesicular e micótica, febre catarral maligna e fotossensibilização (Horrigan, Klingsporn, 1975).

Em bovinos podem ocorrer perdas diretas principalmente em casos de epidemias, ainda que em menor escala do que em ovinos. Os prejuízos causados pelas restrições de mercado impostas à indústria de produtos derivados de bovinos e o embargo e imposição de testes para exportação de animais e sêmen para países livres da doença são, com certeza, mais importantes (Gibbs, Greinner, 1988).

De acordo com os levantamentos sorológicos feitos em vários estados do Brasil, percebe-se que a doença está amplamente distribuída entre as espécies de ruminantes. Os dados obtidos com a sorologia e a falta de relatos de casos clínicos da doença no campo, nas espécies que se apresentam soropositivas, indicam que a LA espalha-se pelos rebanhos do país de forma silenciosa (Cunha, 1988). Condições de temperatura e umidade na maior parte do Brasil favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores, facilitando a endemidade da doença, tornando grande parte da população de ruminantes imune à infecção pelos sorotipos presentes na área (Lobato, 1996).

Levantamentos sorológicos realizados em bovinos demonstraram alta prevalência de anticorpos na espécie, com soropositividade entre 1,2% e 89,7% nos rebanhos

estudados (Moreira et al., 1980; Cunha et al., 1982; Abreu, 1982; Cunha et al., 1988; Silva et al., 1988; Castro et al., 1992). Essa alta positividade deve ser analisada com cautela, pois segundo Campbell e Grubman (1985), muitas das reações podem ser falsas-positivas, pela possibilidade de reações cruzadas entre os diversos sorotipos do vírus e outros membros do gênero *Orbivirus*.

O vírus da LA não foi isolado no Brasil, entretanto, de 60 bovinos de raças zebuínas exportados para os EUA em 1980, os quais lá permaneceram em quarentena por 150 dias, quatro animais desenvolveram anticorpos para VLA quando de realização do primeiro teste naquele País, 30 dias após o último teste feito no Brasil. Setenta e dois dias após sua chegada, mais três animais soroconverteram e mais um no 86º dia. Títulos de anticorpos neutralizantes contra os sorotipos 4 e 20, ambos exóticos para os EUA, foram encontrados. O VLA-4 foi isolado de um destes animais (Campbell e Grocock, 1982).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização geográfica

O trabalho foi realizado em Minas Gerais. O Estado conta com 853 municípios e 679 distritos, e sua superfície é de 588.383,6 Km², correspondendo a 6,89 % do território brasileiro. Sua população bovina é de 20.044.616 animais, possui o maior rebanho leiteiro e é o maior produtor de leite do País (Instituto..., 2001). Está situado na Região Sudeste, entre os paralelos 14°13'57" e 22°55'22" de latitude sul e os meridianos 30°51'23" e 51°02'45" a oeste de Greenwich. Limita-se a norte e nordeste com a Bahia, a leste com o Espírito Santo, a sudeste com o Rio de Janeiro, a sul e sudeste com São Paulo, a oeste com Mato Grosso do Sul e a noroeste com Goiás e Distrito Federal (Instituto..., 2001).

3.2 Propriedades

Foram estudadas 15 propriedades leiteiras de Minas Gerais, nas quais predominou a raça Holandesa, com número variado de animais (23 a 253). Os critérios para a entrada do rebanho no estudo foram: ocorrência de aborto e repetições de cio; interesse de participação na pesquisa por parte do produtor; existência de dados reprodutivos dos últimos anos; controle sanitário dos rebanhos constando a não vacinação para IBR, DVB e LA. Para leptospiroses a vacinação não poderia ter sido feita até três meses antes da coleta de sangue e para brucelose apenas o critério da leitura era diferenciado para os animais vacinados dos não vacinados.

3.3 Animais

Amostras de sangue foram coletadas entre os meses de setembro de 2001 a janeiro de 2002, uma única vez por propriedade. Ela foi feita em todas as fêmeas em idade de reprodução, independente do histórico do animal. Colheram-se 1304 amostras de 15 rebanhos localizados em diferentes localidades do Estado, conforme mostra a Figura 1. Os animais pertenciam à raça Holandesa e suas cruzas, principalmente com a raça Gir, com vários graus de sangue. As propriedades (73,33%) eram "fechadas", isto é, não ocorria entrada de animais de outras propriedades, ou "abertas" (26,67%). A idade dos animais estudados variou de 18 a ≥ 60 meses.

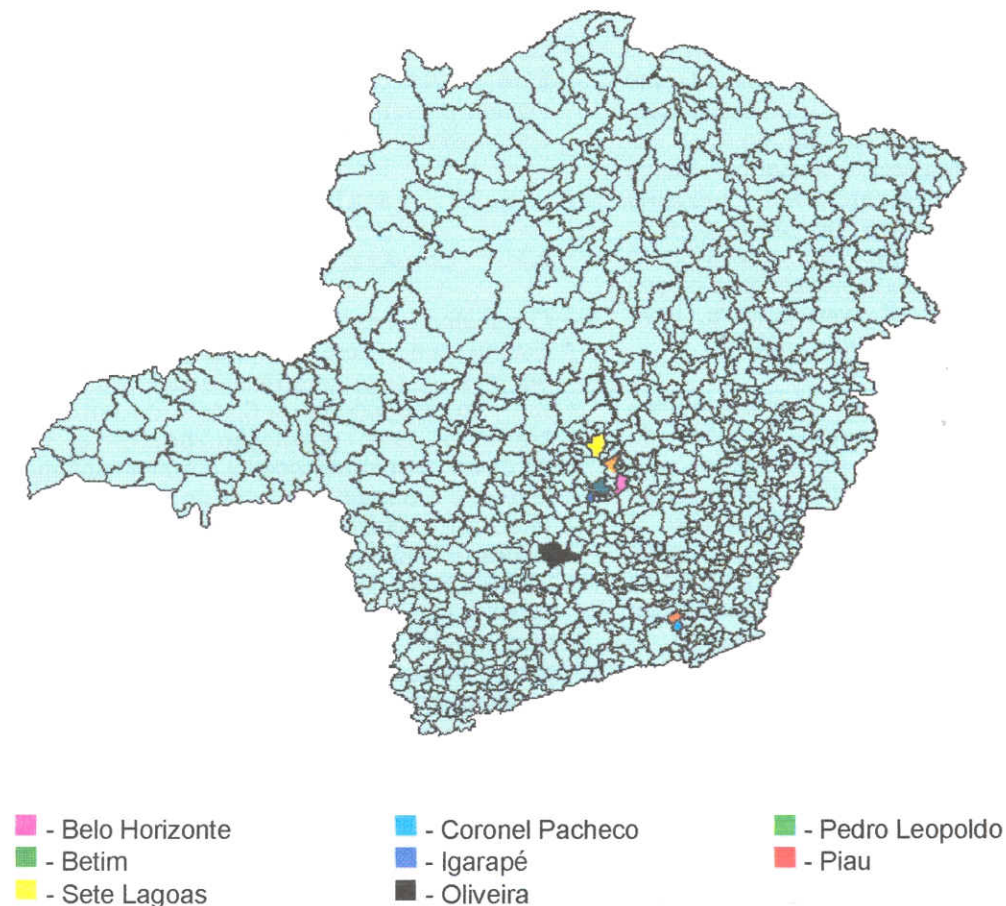


Figura 1: Distribuição dos municípios de Minas Gerais cujos rebanhos participaram do estudo em 2001-2002.

3.4 Dados reprodutivos

Foram anotados e analisados os dados reprodutivos dos anos de 2001 e 2002 fornecidos pelos proprietários, principalmente quanto às ocorrências de abortos, número de partos/animal e número de inseminações feitas na última gestação. A falta de anotações de registros reprodutivos prejudicou, em parte, o estudo da associação entre os dados reprodutivos e os da análise de sangue, pois o número de animais com problemas reprodutivos foi relativamente pequeno.

3.5 Coleta e processamento das amostras

A sangria foi realizada entre os meses de setembro de 2001 e janeiro de 2002, uma única vez em cada animal, por fleboclise na veia coccígea com agulhas múltiplas (21 G x 1"), descartáveis e adaptadas em suporte e tubos com vácuo estéreis, 7 x 100 mm. A coleta de sangue foi realizada em um único dia em cada propriedade. As amostras após permanecerem cerca de quatro horas à temperatura ambiente, eram colocadas algumas horas a 4°C para retração do coágulo e máximo aproveitamento do soro. Após esse período, foi feita a separação do soro em criotubos plásticos devidamente identificados. Retiraram-se duas alíquotas para cada animal, uma para exames de doenças bacterianas e outra para doenças virais. Os soros foram conservados a -20°C até a realização dos exames correspondentes para cada doença, nos diferentes laboratórios de diagnóstico do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

3.6 Microtécnicas utilizadas

3.6.1 Microtécnica de soroneutralização

A microtécnica de soroneutralização foi realizada para diagnóstico de IBR e DVB. Para IBR, a microtécnica de soroneutralização adotou a recomendação do Office Internacional des Epizooties (OIE, 1992) e o protocolo seguido pelo Ministério

da Agricultura e Reforma Agrária (MARA) do Governo Brasileiro.

Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos, diluídos a 1:2 em meio essencial mínimo (MEM) e homogeneizados até diluição final de 1:256. A amostra viral utilizada foi a cepa de referência IBR Colorado 1 (ATCC, VR-864) com títulos de $10^{6,5}$ em 50µl. Utilizaram-se 100 doses infectantes 50% do cultivo celular (TCID₅₀)/50µl de vírus.

As microplacas com a mistura soro-vírus foram incubadas 24 horas em estufa à 37°C e 5% de CO₂, e após esse período, adicionaram-se a cada cavidade 50µl de uma suspensão de células de rim bovino (MDBK), contendo 3×10^5 células/ml, as quais foram incubadas nas mesmas condições anteriores, por 72 horas. A leitura foi realizada em microscópio invertido, para visualização do efeito citopático. Foram consideradas positivas as amostras que neutralizaram 50% das cavidades, calculadas de acordo com o método de Reed e Muench (1938). Paralelamente, foram realizados controles da suspensão celular, da titulação do vírus, da amostra de soro padrão positivo com títulos previamente determinados e do soro padrão negativo. Títulos maiores ou iguais a 4 foram considerados positivos.

Para sorologia de DVB o processo foi o mesmo. A diferença foi apenas quanto à amostra utilizada, isto é, da cepa de referência DVB NADL (ATCC - VR 534) com títulos de $10^{4,23}$ em 50µl reutilizaram-se também 100 doses infectantes 50% do cultivo celular (TCID₅₀)/50µl de vírus. O tempo de incubação das placas também foi diferente, isto é, elas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora. Após esse período a suspensão de células de rim bovino (MDBK), contendo 3×10^5 células/ml, foram adicionadas em cada cavidade e incubadas nas mesmas condições anteriores, por 72 horas. Os títulos e critérios utilizados na leitura foram os mesmos.

3.6.2 Prova do antígeno acidificado tamponado e 2-mercaptoetanol

Para o diagnóstico da brucelose bovina, os soros foram triados pela prova do antígeno acidificado tamponado, realizada segundo Alton et al. (1988). O antígeno consiste na suspensão celular inativada de *Brucella abortus* amostra 1119-3, corada com rosa bengala, diluída 8,0% em solução tampão, pH 3,63 padronizado por comparação com antígeno de referência. Esse antígeno, pelo seu pH, inibe algumas aglutininas inespecíficas e proporciona resultados satisfatórios como método diferencial em soros de animais não vacinados pertencentes a rebanhos classificados como sorologicamente suspeitos.

A técnica consiste em depositar em uma placa de vidro 30µl de soro e a mesma quantidade de antígeno, misturando-as e em seguida praticando movimentos basculantes por quatro minutos para fazer a interpretação dos resultados. A reação positiva ocorre quando há grumos de aglutinação em qualquer quantidade e a reação negativa quando não há grumos de aglutinação.

Os soros positivos nessa prova de triagem foram confirmados na prova de 2-mercaptoetanol conforme recomendação de Alton et al. (1988).

3.6.3 Reação de soroaglutinação microscópica

O teste sorológico pela microtécnica de aglutinação microscópica com antígenos vivos foi a técnica de referência para o diagnóstico das leptospiroses utilizada. As provas foram realizadas segundo Cole et al. (1973), modificada por Herrmann (2002). Os soros diluídos foram processados em microplacas de poliestireno (Nunc F, Dinamarca). As leituras foram feitas em microscópio de campo escuro, equipado com objetiva de longa distância (Axiolab¹, Alemanha). Foram consideradas positivas

¹ Schoott Zeiss do Brasil, Ltda. Av. das Nações Unidas 21711, São Paulo, SP - CEP

as amostras que apresentavam 50% de *Leptospiras* aglutinadas por campo microscópico.

As amostras foram testadas para oito *Leptospiras* pertencentes a cinco sorovariedades: *pomona*, *wolffi*, *grippothyphosa*, *tarassovie*, *bratislava* e *hardjo* variedades, OMS, Norma e bovis.

3.6.4 Técnica de imunodifusão em gel de agarose (IDGA)

Para o diagnóstico da língua azul os soros foram testados por meio da técnica de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), descrita por Jochim e Chow (1969), modificada por Costa (2000).

Utilizaram-se solução de NaCl a 0,85% e agarose na concentração final de 0,9% diluída em água destilada e deionizada. Para fluidificação, a agarose foi levada ao banho-maria até completa homogeneização dos componentes. Sobre as lâminas previamente desengorduradas e secas colocaram-se 4,5ml da solução. Após a solidificação, as lâminas foram armazenadas por 24 horas na câmara úmida para estabilização do gel. Foram feitos orifícios no ágar com furador de sete furos de 3mm de diâmetro com 2,4mm de distância entre os poços. O antígeno foi colocado no poço central e o soro controle positivo nos poços 1 e 4 da roseta (30µl em cada poço). Nos quatro poços restantes colocaram-se os soros a serem testados.

As lâminas permaneceram em câmara umedecida (com azida sódica a 1%) por 48 horas em temperatura ambiente. Foram, então, observadas através de luz indireta e fundo escuro as linhas de precipitação, formadas entre o antígeno e os anticorpos. A identidade da linha formada com o soro controle positivo foi a base para leitura do teste. O antígeno e o soro controle positivo utilizados para as provas sorológicas foram, respectivamente, o antígeno produzido e concentrado 40 vezes na Escola de Veterinária da UFMG e o soro de um animal positivo, testado e titulado frente ao antígeno padrão VMRD.

3.7 Análises estatísticas

A análise descritiva foi feita para demonstrar os resultados sorológicos encontrados nos 15 rebanhos trabalhados para os diferentes agentes pesquisados. Para verificar a associação entre os resultados sorológicos encontrados com os problemas reprodutivos relatado, fez-se teste de dispersão de freqüências (χ^2), com $P \leq 0,05$. Para identificar os animais positivos para uma ou mais das enfermidades com respectivas percentagens, os dados foram analisados utilizando-se pacote estatístico SAS versão 1997. Por ele chegaram-se aos diferentes grupos de animais utilizados para verificar a associação entre as duas variáveis e identificar qual a enfermidade ou qual a

associação entre elas demonstraram maior relação com os problemas reprodutivos registrados no período do estudo. Para demonstrar os resultados da associação entre sorologia com casos de abortos e repetições de cio utilizou-se tabelas de contingência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Freqüência de bovinos soropositivos para brucelose, língua azul, IBR, DVB, e leptospiroses.

Os resultados dos testes sorológicos realizados nos rebanhos analisados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Freqüência de animais positivos para as enfermidades estudadas nos 1304 bovinos oriundos de 15 rebanhos leiteiros em Minas Gerais, 2001-2002.

Enfermidade	Positivo	Percentagem
Brucelose	7	0,54
Leptospiroses	284	21,78
Rinotraqueíte infecciosa bovina	380	29,14
Diarréia viral bovina	425	32,59
Língua azul	776	59,51

Os resultados dos exames sorológicos (Tabela 1) mostram que, apesar dos esforços realizados e dos meios atualmente disponíveis para o diagnóstico e controle da brucelose, LA, IBR, DVB, e leptospiroses, até o momento as medidas adotadas não foram eficazes, pois as enfermidades continuam presentes, causando prejuízos consideráveis ao setor leiteiro do Estado (Leite, 2000). Segundo o autor, à medida que evoluem os processos de produção surgem novas doenças, sem que se eliminem as antigas. Essa preocupação foi confirmada com os resultados desta pesquisa, pois mesmo sendo oriundos de rebanhos leiteiros, nos quais o controle e a tentativa de erradicação da brucelose é severo, a doença continuou presente ainda que em baixa percentagem, servindo como fonte de contaminação e propagação para outros animais. Poester (1997) relatou que

em rebanhos livres de brucelose, a introdução de um ou mais animais é suficiente para que a infecção se difunda rapidamente entre os animais, acarretando perdas acentuadas durante os dois primeiros anos, em consequência de abortos, natimortalidade, infertilidade e baixa produção de leite. Animais infectados introduzidos em rebanhos livres é a forma mais importante para disseminação e propagação da doença em animais susceptíveis.

A percentagem de animais soropositivos variou segundo a enfermidade pesquisada, indicando que medidas de prevenção devem ser adotadas para diminuir a propagação e os prejuízos por elas causados ao setor leiteiro. A variação também ocorreu dentro de rebanho conforme a enfermidade, provavelmente devido a diferenças no manejo e na forma

de criação. Os rebanhos com maior número de animais com sorologia positiva para as enfermidades estudadas foram justamente aqueles com intenso trânsito de animais, com a introdução sendo feita sem se respeitar o período de quarentena. Lyaku et al. (1991) alertaram sobre a possibilidade de a introdução de raças exóticas e o uso de sêmen importado terem contribuído para a disseminação de doenças infecciosas nos rebanhos, principalmente nos de manejo intensivo.

4.1.1 Língua Azul

A enfermidade que apresentou maior número de animais com sorologia positiva foi a LA (59,51%), porém essa alta positividade deve ser analisada com

cautela. Segundo Campbell e Grubman (1985), muitas dessas reações podem ser falsas-positivas, pela possibilidade de reações cruzadas entre os diversos sorotipos desse vírus e outros membros do gênero *Orbivirus*.

Em todas as propriedades trabalhadas foram encontrados animais com anticorpos para o agente (Tabela 2), indicando que ele está amplamente disseminado no Estado. Sua ampla distribuição no país já foi demonstrada por outros autores (Moreira et al., 1980; Cunha et al., 1982; Abreu, 1982; Cunha et al., 1987; Cunha et al., 1988; Silva et al., 1988; Castro et al., 1992; Lobato, 1999; Lobato, 2000), o que reforça a necessidade de controle do agente para evitar ou diminuir sua propagação.

Tabela 2 – Frequência de animais soropositivos para língua azul detectados pelo teste de imunodifusão em gel de ágar, em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Propriedade	Número de animais coletados	Número de bovinos positivos	Porcentagem
A	31	16	51,61
B	106	72	67,92
C	43	15	34,88
D	64	37	57,81
E	253	167	66,00
F	98	74	75,51
G	44	27	61,36
H	124	72	58,06
I	65	44	67,69
J	23	14	60,87
K	120	61	50,83
L	143	74	51,75
M	112	57	50,89
N	55	31	56,36
O	23	15	65,21
Total	1304	776	59,51

Uma das explicações para justificar o elevado número de animais soro positivos para LA no presente trabalho é o fato de os bovinos infectados com o vírus poderem apresentar viremia prolongada (100 dias). Isso aumenta a probabilidade de contaminação de mais mosquitos transmissores e, conseqüentemente, eleva o número de bovinos infectados. Após a infecção pelo VLA os bovinos desenvolvem

resposta imune humoral, que pode ser detectada de 14 a 28 dias. Os anticorpos neutralizantes podem ser detectáveis aos testes sorológicos, conforme descrito por Pearson e Jochim (1979), por pelo menos três anos após a infecção, fato que pode ter contribuído para elevar o número de animais soro positivos. A época de coleta dos soros pode também ter contribuído para aumentar a porcentagem de animais soropositivos,

isto é, ela coincidiu com o período de chuvas no Estado, quando a temperatura e a umidade elevadas provavelmente favoreceram a multiplicação e manutenção dos vetores (*Culicídeos*), facilitando a endemicidade da doença (Lobato 1996).

A alta porcentagem de animais positivos também se justifica pelo fato de os animais serem estabulados ou criados sob condições intensivas. Segundo Cunha *et al.* (1988), estes animais são mais susceptíveis aos vetores talvez pela alta concentração ou pelas características das propriedades, como a umidade elevada e a presença de água parada que favoreceram a presença e multiplicação dos mosquitos. Essas afirmações coincidem com os resultados do trabalho, pois foi justamente no rebanho alojado em sistema "free-stall", com alta concentração de animais e maior presença de água no piso das instalações, que ocorreu a mais elevada porcentagem de animais com sorologia positiva (75,51%).

A alta ocorrência de animal com sorologia positiva para LA é indicativo de que o vírus está circulando no ambiente de forma intensa. Levantamentos sorológicos feitos em vários estados do Brasil demonstraram que o agente está espalhado entre diversas espécies de ruminantes. Os dados obtidos com a sorologia e o não relato de casos clínicos da doença no campo nas espécies que se apresentam soropositivas indicam que a LA espalha-se pelos rebanhos do país de forma silenciosa (Cunha, 1998). Por isso, é importante lembrar que mudanças climáticas em regiões limítrofes das áreas endêmicas, movimentação de animais, mudança nas características da estação chuvosa e, principalmente, movimento dos ventos, podem trazer os vetores *Culicoides* de regiões distantes para áreas com grande número de animais susceptíveis, podendo provocar mudanças na prevalência e ocorrência clínica da LA.

A identificação dos sorotipos presentes em Minas Gerais seria de extrema importância não só para fins de exportação e maior segurança na importação de animais, mas também para elaboração de vacinas, caso ocorrerem surtos da doença. O vírus nunca

foi isolado no Brasil e a informação que se tem é que são muitos os sorotipos presentes nos rebanhos (Campbell e Grocock, 1982).

4.1.2 Diarréia viral bovina

Das 15 propriedades visitadas, 14 (93,33%) tinham animais positivos no teste de soroneutralização (Tabela 3), e dos 1304 soros testados, 425 (32,59%) apresentaram reações positivas, com títulos variando de 4 a ≥ 256 . A maioria dos animais positivos apresentou títulos elevados, sugerindo atividade viral nos rebanhos. A porcentagem de positivos dentro das propriedades foi bastante variada (1,89% a 90,18%) e a titulação também. O título 128 foi o mais encontrado (20,47%). Os demais títulos com as respectivas porcentagens foram: 4 (6,59%); 8 (7,29%); 16 (12,24%); 32 (14,82%); 64 (16,00%); 256 (15,06%) e > 256 (7,53%).

Apesar da alta porcentagem de animais positivos e dos altos títulos encontrados no trabalho, não se pode afirmar que o agente esteja produzindo a doença clínica. Nem mesmo a hipótese de que os animais com títulos baixos estejam em início de infecção ou queda final de anticorpos pode ser comprovada. Para isso seria necessário o acompanhamento sorológico, utilizando-se a sorologia pareada ou o isolamento do vírus de animais com sintomatologia clínica.

Os resultados sugerem que o vírus é endêmico no Estado. Levantamentos sorológicos regionais têm mostrando que a prevalência é alta em todas as regiões do país (Lemos, 1998). Estes achados confirmam os de Rweyemamu *et al.* (1990), quando mostraram que o vírus é endêmico na América do Sul. Todos esses resultados permitem afirmar que a BVD esta distribuída por toda a população de bovinos do País (Lemos, 1998). Essa situação epidemiológica sugere que, a curto prazo, a adoção de uma política regional ou nacional de erradicação da doença, com base na identificação, eliminação e não introdução de animais soropositivos no

rebanhos, é inviável. Os requisitos para esses programas têm que merecer atenção especial, pois os custos são altos e devem

ser comparados às perdas nacionais com a infecção.

Tabela 3 – Frequência de animais soropositivos para diarreia viral bovina, detectados pelo teste de soroneutralização, em 15 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Propriedade	Número de animais coletados	Número de bovinos positivos	Porcentagem
A	31	14	45,16
B	106	2	1,89
C	43	6	13,95
D	64	3	4,69
E	253	8	3,16
F	98	4	2,99
G	44	16	36,36
H	124	81	65,32
I	65	4	6,15
J	23	7	30,43
K	120	14	11,67
L	143	123	86,01
M	112	101	90,18
N	55	42	76,36
O	23	0	0,00
Total	1304	425	32,59

A vacinação, de acordo com a realidade brasileira, é o meio mais vantajoso em relação ao custo-benefício, e a decisão de vacinar ou não os animais, segundo Bolin (1995), deve basear-se na análise de risco de contaminação e ocorrência de doença clínica no plantel. Leite (1999) recomenda vacinar as novilhas após seis meses de idade e revaciná-las antes da cobertura ou aos 18 meses, justificando ser essa a faixa etária com maior número de animais não infectados. Estes quando incorporados ao rebanho contaminado, teriam níveis de anticorpos suficientes para não desenvolver o quadro clínico.

4.1.3 Rinotraqueíte infecciosa bovina

Os resultados dos testes de soroneutralização para identificar animais com sorologia positiva para IBR demonstraram que 29,14% (Tabela 4) dos animais apresentaram títulos considerados positivos (4 a >256). Isso indica que o vírus está amplamente disseminado nos rebanhos bovinos de leite de Minas Gerais,

semelhantes aos resultados relatados por Pituco (1988) e Vidor et al. (1995), que mostraram a disseminação do agente nos rebanhos brasileiros. Estes achados mostram que a infecção HBV-1 apresenta caráter endêmico. Doze (80%) das 15 propriedades pesquisadas apresentaram animais com sorologia positiva no teste e apenas três (20%) delas foram negativas. Ocorreu variação acentuada quanto à porcentagem de animais positivos entre propriedades (1,64 a 69,09%). Essas diferenças, segundo Durhan e Howard (1990), são um reflexo de que o vírus distribui-se de maneira diferenciada, provavelmente devido às práticas de manejo. A variação confirma a hipótese de que a maior fonte de infecção de enfermidades infecciosas é a introdução de animais infectados vindos de outras propriedades sem controle sanitário. Isto foi observado neste estudo.

O título > 256 foi o mais encontrado entre os soros reagentes (25,79%). As demais titulações foram: 4 (7,89%); 8 (13,16%); 16 (9,47%); 32 (10,79%); 64 (11,05%); 128

(11,58%) e 256 (10,26%). O grande número de animais com títulos elevados demonstra que o contato com o vírus foi relativamente recente e que pode estar ocorrendo atividade viral entre os animais.

No rebanho F (Tabela 4), a frequência de anticorpos para IBR foi de 48,98%. Nos rebanhos B (0,00%), C (9,30%) e E (1,58%) a frequência foi nula ou muito baixa e todos eles localizavam-se no mesmo município do rebanho F, mas apenas este adotava o sistema "free-stall". Segundo Msolla et al. (1983), esse tipo de sistema possivelmente altera o modelo epidemiológico do HVB-1, facilitando a transmissão e a manutenção do agente infeccioso. Animais mantidos em sistema "free-stall", segundo esses autores, têm probabilidade de se infectarem com maior carga viral e de manterem o *status* de sorologicamente positivos por período mais

longo. Essas afirmações foram confirmadas pelos resultados da presente pesquisa e serviram para reforçar que os animais mantidos em sistema "free-stall" são mais propensos a contraírem doenças infecciosas, por isso os cuidados com a sanidade deles devem ser redobrados.

Lyaku et al. (1991) citaram que os programas de incentivo ao desenvolvimento da bovinocultura, nos quais animais com melhor potencial genético são introduzidos em rebanhos nativos, têm sido responsáveis pela introdução do vírus HVB-1. Isso foi observado neste trabalho. As propriedades que tentaram melhorar os índices de produção pela compra e introdução de animais mais produtivos apresentaram as maiores percentagens de animais com sorologia positiva para IBR.

Tabela 4 - Frequência de animais soropositivos para rinotraqueite infecciosa bovina detectados pelo teste de soroneutralização, em 15 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Propriedade	Número de animais	Número de bovinos positivos	Porcentagem
A	31	16	51,61
B	106	0	0,00
C	43	4	9,30
D	64	0	0,00
E	253	4	1,58
F	98	48	48,98
G	44	28	63,64
H	124	71	57,26
I	65	0	0,00
J	23	4	17,39
K	120	33	27,50
L	143	57	39,86
M	112	72	64,29
N	55	38	69,09
O	23	5	21,73
Total	1304	380	29,14

A IBR está amplamente distribuída na população de bovinos do País (Pituco, 1988; Vidor et al., 1995). Essa situação epidemiológica sugere que, a curto prazo, a adoção de uma política regional ou nacional de erradicação da doença, que consiste na identificação, eliminação e não introdução de animais soropositivos nos rebanhos, é inviável. Para Leite (1999), só é possível

adotar essa política em rebanhos relativamente pequenos, nos quais a movimentação dos animais pode ser acompanhado e a frequência de animais soropositivos é baixa. No caso do Brasil, onde a sorologia é alta e às vezes desconhecida, Leite (1999) recomenda vacinar as novilhas após seis meses de idade e revaciná-las antes da cobertura ou aos 18 meses. Segundo esse autor, a

vacinação não confere imunidade total e duradoura, mas minimiza a sintomatologia clínica e evita prejuízos.

4.1.4 Leptospiroses

Doze (80%) das 15 propriedades visitadas apresentaram animais positivos ao teste de microaglutinação para leptospiroses (Tabela 5). Observou-se grande variação quanto à percentagem de animais positivos entre os rebanhos (0,00% a 79,46%). Isso provavelmente pode ser atribuído à diferença no manejo dos animais. A sorovariedade *hardjo* variedade *Norma* (18,10%) foi a mais encontrada neste estudo, coincidindo com os resultados encontrados por Miller et al. (1991), Moreira (1994), Vasconcellos et al. (1996) e Herrmann (2002). Segundo esses autores, ela é a de maior impacto econômico e a que mais afeta a eficiência reprodutiva dos bovinos.

Foram encontrados 284 animais positivos para leptospiroses, que apresentaram 791 reações, média de 2,7 reações por animal. Isso revela que são várias as sorovariedades presentes nos rebanhos, e que muitas delas podem ser reações falsas positivas, pela possibilidade de serem

reações cruzadas entre as sorovariedades testadas. O percentual de animais sororeagentes ficou entre 20 e 70%, semelhante aos resultados encontrados por Miller et al. (1991), Moreira (1994), Vasconcellos et al. (1996) e Herrmann (2002). Segundo Tedesco (1997), as leptospiroses em bovinos são doenças ainda em expansão no país.

Outras sorovariedades também foram detectadas. A *hardjo* variedade *OMS* (14,49%) foi a segunda mais prevalente, seguida pela *hardjo bovis* (11,96%), *pomona* (9,36%) e *Wolffi* (6,75%). Outras sorovariedades de leptospiroses presentes nos rebanhos bovinos, como a *pomona*, segundo Moreira (1994) e Leite (2000), também podem causar grandes prejuízos aos bovinos, sendo responsáveis por surtos de abortos. Os títulos encontrados nas respectivas reações foram bastante variados, sendo o título 100 o primeiro a ser considerado como animal positivo. A titulação mais alta foi 3200, encontrada em sete animais, todas na sorovariedade *hardjo* variedades *OMS* (5), *Norma* (3), *bovis* (1). Isso sugere que o agente está circulando nos rebanhos e pode ser um dos responsáveis por surtos de aborto ocorridos no período de estudo.

Tabela 5 - Frequência de animais soropositivos para leptospiroses detectados pelo teste de aglutinação microscópica em 15 propriedades de rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Rebanho	Animais	Positivos para leptospiroses (%)	<i>Pomona</i>	<i>Hardjo OMS</i>	<i>Wolffi</i>	<i>Hardjo bovis</i>	<i>Hardjo Norma</i>
A	31	18 (59,06)	8	14	4	18	16
B	106	14 (13,21)	4	10	2	5	14
C	43	6 (13,95)	2	2	1	1	6
D	64	3 (4,69)	0	2	0	2	3
E	253	14 (5,53)	3	6	3	6	13
F	98	0 (0,00)	0	0	0	0	0
G	44	4 (9,09)	0	3	1	3	4
H	124	49 (39,52)	29	36	15	26	29
I	65	22 (33,85)	11	17	9	11	13
J	23	0 (0,00)	0	0	0	0	0
K	120	0 (0,00)	0	0	0	0	0
L	143	5 (3,50)	3	2	1	1	5
M	112	89 (79,46)	36	60	19	52	76
N	55	43 (78,18)	14	21	23	25	43
O	23	17 (73,91)	12	16	10	6	14
Total	1304	284 (21,77)	122	189	88	156	236

Os rebanhos negativos para leptospiroses (20,00%), provavelmente encontram-se em propriedades consideradas "fechadas", onde não ocorreu à entrada de animais portadores e transmissores do agente. A não ocorrência de animais positivos nessas propriedades se deve ao não contato deles com *Leptospira sp.*

Os títulos aglutinantes nos soros dos animais positivos para *Leptospira sp* variaram de 100 a 3200. Eles revelam que o contato do agente com os animais foi recente. Segundo Ellis (1994), títulos superiores a 100 na sorovariedade *hardjo* indicam exposição prévia, ou indicio de infecção ativa. Vasconcelos (1997) afirmou que títulos de 100 a 200 são indicativos de contato com antígenos de *leptospira sp*, mas não caracterizam uma infecção recente, enquanto que valores iguais ou superiores a 400 são sugestivos de doença ativa. Com tais afirmações sugere-se que esteja ocorrendo circulação de *Leptospira sp* nos rebanhos, trazendo como consequência transtornos reprodutivos. Isso foi comprovado em uma das propriedades analisadas, onde o índice de abortos e natimortos atingiu 14% no ano e os títulos encontrados para *Leptospira sp*, incluindo aquelas consideradas importantes causadoras de abortos para bovinos, foram muito altos, sugerindo atividade viral no rebanho.

Frente aos evidentes prejuízos, após a coleta de soro dos animais que abortaram e das fêmeas prenhes em estágio avançado, cuja sorologia revelou a presença de *Leptospira sp*, com títulos elevados em muitos animais, optou-se pelo tratamento de todas as fêmeas prenhes. O tratamento de 56 animais mostrou bons resultados, pois apenas dois deles abortaram e os 54 restantes levaram a gestação a termo. Estes

resultados confirmaram a suspeita de serem *leptospiras sp.* as causas de aborto, suportando a hipótese de que elas são responsáveis, em parte, pelos transtornos reprodutivos em rebanhos leiteiros do Estado.

4.1.5 Brucelose

Para brucelose, apenas duas (13,33%) das 15 propriedades foram positivas, com sete (0,54%) animais reagentes, sendo seis oriundos de uma propriedade e apenas um de outra (Tabela 6). A baixa ocorrência explica-se pelo fato de a vacinação ser obrigatória no Estado. Além disso, nos rebanhos realizaram-se testes anuais para identificação de animais reagentes, com eliminação dos positivos, por serem eles fonte de infecção.

Os resultados são muito inferiores aos encontrados em 1980 em Minas Gerais, quando a prevalência foi de 6,7% (Ministério..., 2001). Essa diferença deve-se ao fato de a pesquisa ter sido feita com rebanhos controlados, com pequeno número de animais, enquanto que a realizada pelo Ministério foi de um levantamento mais amplo, com grande número de propriedades e de animais, abrangendo rebanhos de leite e de carne. Mais ainda, a baixa frequência de animais positivos era esperada em razão de trabalhos realizados no Estado com esse objetivo. Ela revela que os esforços com o intuito de erradicar o agente estão sendo efetivos e já proporcionaram bons resultados. Também mostra que as estratégias escolhidas estão certas e que a vacinação das bezerras de três a oito meses com vacina com amostra viva B19 de *Brucella abortus*, citada por Thoen e Cheville (1995), é a melhor forma de erradicação da enfermidade.

Tabela 6 - Frequência de animais soropositivos para brucelose detectados pelo teste do antígeno acidificado tamponado e confirmados pelo 2-mercaptoetanol em 15 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Propriedade	Número de animais analisados	Número de animais positivos	Porcentagem
A	31	0	0,00
B	106	0	0,00
C	43	0	0,00
D	64	0	0,00
E	253	1	0,39
F	98	0	0,00
G	44	0	0,00
H	124	0	0,00
I	65	0	0,00
J	23	0	0,00
K	120	0	0,00
L	143	0	0,00
M	112	0	0,00
N	55	6	10,90
O	23	0	0,00
Total	1304	7	0,53

Levantamentos sorológicos para acompanhamento dos rebanhos, com identificação e eliminação dos animais positivos, também podem contribuir para a rápida erradicação do agente no País. É importante salientar que todos esses trabalhos só terão êxito com a efetiva participação e colaboração dos produtores, pois sem a ajuda deles não será possível eliminar a doença, que vem provocando perdas econômicas significativas na pecuária brasileira, prejudicando o desenvolvimento e o comércio de animais e de seus derivados.

4.2 Associação entre sorologia para língua azul, IBR, DVB e leptospiroses, com problemas de aborto e repetições de cio.

A brucelose, embora acarrete grandes prejuízos à pecuária, prejudicando a reposição do rebanho e o comércio de animais e de produtos derivados, não participou das análises de associação em função do baixo número de animais com sorologia positiva, apenas sete. Ainda assim, Almeida e Reis (1999) citaram que os efeitos da doença sobre os rebanhos são severos e se manifestam por aborto

retenção de placenta, metrites, subfertilidade e até infertilidade. Os fatores que determinam a porcentagem de abortos são o estágio de gestação no momento de introdução da doença e o número de fêmeas em gestação. Mesmo a doença não tendo participado das análises, sua importância não deve ser negligenciada quanto aos aspectos reprodutivos. Dos sete animais positivos para a enfermidade, seis apresentavam relatos de aborto. Estes resultados são apenas sugestivos pelo fato de os seis animais terem apresentado sorologia para outras duas ou mais enfermidades estudadas, o que impossibilitou concluir pela causa dos abortos. O mais provável é que a principal causa tenha sido a somatória das enfermidades. Isto pode ser constatado na Tabela 7. Os animais que apresentaram sorologia positiva para três ou mais enfermidades, com exceção dos grupos onde estavam presentes as *Leptospiras sp*, apresentaram associação entre positividade aos testes sorológicos e ocorrência de abortos. A presença de mais de uma das doenças estudadas pode significar maiores prejuízos à produção. Por essa razão, é indispensável a adoção de políticas preventivas, na tentativa de impedir que

essas enfermidades se difundam entre os rebanhos de Minas Gerais. No entanto, se as elas estiverem disseminadas, como foi

constatado nesta pesquisa, deve-se aprender a conviver com elas.

Tabela 7- Frequência observada dos grupos de animais com ou sem aborto encontradas na sorologia e significância das análises estatísticas, em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Grupo de animais conforme sorologia	Total de animais	Bovinos com aborto	Bovinos sem Aborto	Percentagem dos positivos
Controle (negativos)	247	41 (51,14)	206 (195,85)	16,60
LA	402	62 (63,80)	340 (338,20)	15,42
IBR	45	7 (7,39)	38 (37,60)	15,56
LA * IBR	60	10 (9,96)	50 (50,03)	16,67
DVB	50	10 (8,58)	40 (41,41)	20,00
LA * DVB	75	11 (12,11)	64 (62,88)	14,67
IBR * DVB	72	14 (12,41)	58 (59,58)	19,44
LA* IBR * DVB	69	19 (3,10)	50 (55,89)	27,54 ^a
LEP	28	10 (5,19)	18 (22,80)	35,71 ^a
LA * LEP	66	18 (12,44)	48 (53,35)	27,27 ^a
IBR * LEP	12	5 (2,13)	7 (9,86)	41,67 ^a
LA * IBR * LEP	19	9 (3,57)	10 (15,42)	47,37 ^a
DVB * LEP	29	9 (4,93)	20 (24,06)	31,03 ^a
LA * DVB * LEP	27	9 (4,92)	18 (22,07)	33,33 ^a
IBR * DVB * LEP	45	14 (8,47)	31 (36,52)	31,11 ^a
LA * IBR * DVB * LEP	58	25 (12,55)	33 (45,44)	43,10 ^a

LA = língua azul; IBR = rinotraqueite infecciosa bovina; DVB = diarreia viral bovina; LEP=leptospiroses

Números entre parênteses indicam a frequência esperada

^a = P<0,05; as comparações pelo teste de dispersão de frequência foram entre o grupo controle e cada um dos grupos sorológicos.

A análise realizada para associar os resultados sorológicos com a ocorrência de abortos demonstrou que há relação entre as duas variáveis (P≤0,05). Entre os animais positivos para as infecções ocorreram mais

abortos do que entre os de sorologia negativa. Os resultados mostram também que há mais relação entre ocorrência de abortos e soropositividade quando as doenças estão associadas em um mesmo animal (Tabela 8).

Tabela - 8 Frequência sorológica para as enfermidades estudadas, associando-as com os abortos ocorridos em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Grupo de animais	Número de animais	Animais com abortos	Animais sem Abortos	Percentagem dos positivos
Controle / LA	528	113 (111,75)	415 (416,24)	21,40
Positivos LA	776	163 (164,24)	613 (611,75)	21,00
Controle / IBR	924	167 (191,31)	757 (732,64)	18,07
Positivos IBR	380	103 (80,54)	277 (301,31)	27,10 ^a
Controle / DVB	879	162 (182,00)	717 (696,99)	18,43
Positivos DVB	425	108 (87,99)	317 (337,00)	25,41 ^a
Controle / LEP	1020	173 (210,41)	847 (809,58)	16,96
Positivos LEP	284	96 (58,58)	188 (225,41)	33,80 ^a

LA = língua azul; IBR = rinotraqueite infecciosa bovina; DVB = diarreia viral bovina; LEP=leptospiroses

Números entre parênteses indicam a frequência esperada

^a = P≥0,05

Os resultados apenas sugerem associação devido à impossibilidade de serem determinadas as causas de abortos. Segundo Dubey et al. (1992) e Guitián et al. (1999), esta é uma tarefa difícil, pois apenas 25 a 30% dos casos podem ser diagnosticados. Para Auduriz et al. (2001) 90% das possíveis causas de diagnóstico de aborto são infecciosas. Essa percentagem é atribuída à maior disponibilidade de técnicas para a sua identificação nos laboratórios de sanidade animal. Ao contrário, as causas não infecciosas (genéticas, tóxicas, nutricionais) requerem métodos mais especializados e são menos estudadas.

Guitián et al. (1999) afirmaram que levantamentos sorológicos são úteis para identificar as possíveis causas de transtornos reprodutivos, porém a sua interpretação é complicada até mesmo quando os dados são pareados, podendo levar a conclusões errôneas. A interpretação dos resultados pode ser dificultada pela possibilidade de os anticorpos serem de origem vacinal ou induzidos por infecções anteriores.

A análise de contingência para os resultados sorológicos com repetições de cios mostrou que a associação não foi significativa (Tabela 9).

Tabela 9 - Freqüência observada nos grupos de animais com ou sem repetição de cio encontradas na sorologia e significância das análises estatísticas, em 15 rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, 2001-2002.

Grupo de animais conforme sorologia	Total de animais	Animais com repetição de cio	Animais sem repetição de cio	Percentagem dos positivos
Controle (negativo)	247	67 (63,00)	180 (183,92)	27,13
LA	402	118 (114,59)	284 (287,40)	29,35
IBR	45	11 (12,02)	34 (32,97)	24,44
LA * IBR	60	13 (15,63)	47 (44,36)	21,67
DVB	50	14 (13,63)	36 (36,36)	28,00
LA * DVB	75	18 (19,79)	57 (52,20)	24,00
IBR * DVB	72	19 (19,41)	53 (52,58)	26,39
LA * IBR * DVB	69	18 (18,56)	51 (50,43)	26,09
LEP	28	10 (7,84)	18 (20,16)	35,71
LA * LEP	66	14 (17,07)	52 (48,92)	21,21
IBR * LEP	12	0 (3,10)	12 (8,89)	0,00
LA * IBR * LEP	19	2 (4,92)	17 (14,07)	10,53
DVB * LEP	29	5 (7,56)	24 (21,43)	17,24
LA * DVB * LEP	27	8 (7,39)	19 (19,60)	29,63
IBR * DVB * LEP	45	44 (10,94)	41 (34,05)	8,89
LA * IBR * DVB * LEP	58	12 (15,02)	46 (42,97)	20,69

LA = língua azul; IBR = rinotraqueite infecciosa bovina; DVB = diarreia viral bovina; LEP=leptospiroses

Números entre parênteses indicam a freqüência esperada

a = $P < 0,05$; as comparações pelo teste de dispersão de freqüência foram entre o grupo controle e cada um dos grupos sorológicos.

Segundo Ferreira (1991) e Loeffler et al. (1999), o estabelecimento da gestação depende do reinício da atividade ovariana e do ambiente uterino apropriado para receber o novo produto da concepção. Bowman (2002) apontou o estresse calórico como um dos grandes responsáveis pela diminuição da fertilidade, podendo afetar a capacitação espermática, o transporte do

ovócito e a fertilização, além de prejudicar o desenvolvimento embrionário, aumentando o número de embriões degenerados que apresentam menor capacidade de produzir o complexo de proteínas responsáveis pelo reconhecimento materno da gestação. Estresse calórico nas regiões estudadas, juntamente com outros fatores já conhecidos, podem estar relacionados com

repetições de cio, já que não se observa associação significativa entre repetições de cios e sorologia.

As análises de associação revelaram que as doenças infecciosas contribuíram com perdas da produção e que elas poderiam se agravar se o manejo adotado não for correto. Algumas das doenças estudadas causaram mais prejuízos à reprodução do que outras (Tabela 7), contudo todas elas devem ser tratadas com a mesma seriedade e cautela para impedir sua propagação. O grau de relacionamento poderia ter sido melhor se as propriedades trabalhadas dispusessem de informações mais completas e organizadas sobre os problemas reprodutivos ocorridos. Em muitos casos os registros estavam incompletos, o que prejudicou a avaliação do desempenho reprodutivo. Segundo Fernandes (2001), as anotações de eventos reprodutivos são valiosas ferramentas para a obtenção de índices reprodutivos e, conseqüentemente, da avaliação da eficiência reprodutiva. Quanto mais completas e acuradas forem as informações disponíveis, maior o número de índices que poderão ser calculados e interpretados.

LA foi a doença com maior número de animais com sorologia positiva. Associando-a os com os problemas reprodutivos observa-se que não há interferência dela na reprodução (Tabela 7). Estes resultados confirmaram que o vírus não causou maiores danos aos bovinos adultos, aspecto já descrito por Osburn (1985). Segundo esse autor, os prejuízos podem ocorrer somente em casos de epidemias, ainda assim em menor escala em relação ao que acontece com os ovinos. Os prejuízos causados pelas restrições de mercado imposto à indústria dos produtos derivados de bovinos e o embargo e imposição de testes para exportação de animais e sêmen para Países livres da doença são, com certeza, muito importantes (Gibbs, Greinner, 1988).

Quanto à IBR, alguns estudos mostraram que há associação entre a ocorrência da doença e falhas na reprodução. Essa pode estar diretamente ligada a problemas no

útero ou nos ovários ou a problemas relacionados com o embrião ou feto (Miller, 1991; Lobato, 2000). Neste estudo a associação entre sorologia e ocorrência de aborto se verificou somente quando a IBR foi analisada de forma isolada (Tabela 8), sem se preocupar com a participação dos outros agentes. Ao se considerar as outras doenças mais IBR nas análises, não se observou a associação (Tabela 7). A não relação pode ser atribuída ao fato de terem sido encontrados poucos animais no grupo com sorologia positiva apenas para essa enfermidade, já que a maior parte dos que apresentavam sorologia positiva eram também positivos para outras doenças. Este fato pode ter impedido de se conhecer os reais danos causados à reprodução nos animais infectados pela IBR.

Também pode ter contribuído para a não associação entre as variáveis reprodutivas e a IBR o fato de os anticorpos presentes no soro dos animais terem sido induzidos há meses ou até há anos. Isto é possível pois, segundo Gibbs e Rweyemamu (1977), os anticorpos são detectáveis na corrente sanguínea uma semana após a infecção pelo HVB-1 e podem persistir por anos. Guy e Potgieter (1985) citaram que eles podem persistir até cinco anos. Os altos títulos podem ter ocorrido em função de infecções latentes, provocadas pelas constantes situações de estresse às quais os animais foram submetidos. Ackermann et al. (1982) e Lobato (2000) descreveram essa possibilidade pelo fato de o agente poder permanecer em estado de latência, alojado nos gânglios nervosos, e ser reativado em situações estressantes ou de tratamentos prolongados com corticóides.

Canant (1984, 1985) e Kirkbride (1985) verificaram que nos rebanhos infectados pela IBR aproximadamente 30% das fêmeas gestantes podem abortar entre três e seis semanas após a infecção, e que a maior frequência de abortos ocorre entre as que estão no segundo trimestre de gestação. Segundo os autores, nessa fase é mais fácil observar o problema, contudo o HVB-1 pode comprometer o desenvolvimento do embrião e do feto em qualquer período da gestação, podendo ocasionar o aborto em

qualquer fase da gestação. Isso não foi constatado nos rebanhos estudados, o que sugere que a grande maioria dos animais infectados não teve contato recente com o agente e que os títulos altos podem ser atribuídos a infecções latentes. Miller e Van Der Martin (1986), em condições experimentais, perceberam que infecções latentes reativadas por estresse ou outro fator, não provoca lesões uterinas nem danos ao feto ou ao embrião. Este aspecto, talvez justifique a não constatação de abortos e a não associação entre as variáveis.

Há relação entre as variáveis se se levar em conta apenas os resultados sorológicos para IBR (Tabela 8) e associa-los com os abortos, ignorando a colaboração de outros agentes. Isso mostra a possibilidade de outros agentes estarem contribuindo para que essa enfermidade possa causar danos à reprodução e que a sorologia não é a maneira mais indicada para se chegar ao diagnóstico das causas de aborto. Ela deve ser usada para apontar as possíveis causas e mostrar os caminhos que devem ser seguidos para a solução do problema.

Para DVB, observou-se associação entre sorologia positiva e ocorrência de abortos (Tabela 8). Essa relação foi descrita por Flores (2000), que verificou a possibilidade de o vírus provocar perdas reprodutivas atribuídas à infertilidade temporária, à mortalidade embrionária, ao aborto ou mumificação fetal, à malformação, à natimortalidade ou ao nascimento de bezerras fracas e inviáveis. O que determina os danos que o vírus vai causar na reprodução é o estágio da gestação dos animais infectados e o grau de resistência ao agente infeccioso. As mesmas justificativas apresentadas para IBR são válidas para DVB quanto à não significância nas análises das doenças quando agrupadas. As percentagens até foram superiores às encontradas para a IBR. A não associação entre sorologia positiva para o VDVB e a ocorrência de abortos pode ser atribuída ao fato de a cepa infectante ser de baixa virulência. Para Bolin (1995), a virulência do vírus depende do biotipo, das

variações entre as cepas, da via e do tempo de exposição dos animais ao agente.

Outro aspecto que pode justificar a não associação entre abortos e soropositividade para DVB é o fato de muitos animais positivos o serem para outras doenças infecciosas. Segundo Durham e Howard (1990), isto se deve ao fato de o vírus da DVB provocar depleção das células linfóides durante a fase de diarreia aguda, levando ao estado de imunossupressão, com conseqüente aumento da susceptibilidade às infecções.

De todas as enfermidades trabalhadas, as leptospiroses foram as que apresentaram maior associação entre sorologia positiva e os casos de abortos (Tabela 7). Estes dados servem para alertar sobre a possibilidade de a enfermidade estar causando prejuízos à pecuária nacional e da necessidade de trabalhos que visem seu controle, já que erradicar o agente é difícil pelo fato de ele estar amplamente distribuído entre animais silvestres, o que os tornam prováveis fontes de infecções para os animais domésticos. O teste utilizado para detectar os animais soropositivos foi o de microaglutinação microscópica (MAT), que detecta imunoglobulinas do tipo IgM. Estas permanecem por um curto período no soro dos animais, logo, os positivos ao teste tiveram contato recente com *Leptospira sp.* Isto se comprovou pelos altos títulos encontrados em diversas das sorovariedades pesquisadas. Vasconcellos (1997) afirmou que títulos superiores a 400 são sugestivos da presença da doença ativa. Observou-se que há relação entre a enfermidade e a ocorrência de abortos, sugerindo que as *leptospiras sp* são uma das principais causas de surtos de abortos

Dhaliwal et al. (1996) afirmaram que as leptospiroses são as mais importantes causas de falhas reprodutivas dos bovinos e que na maioria das vezes o aborto é o único sinal clínico perceptível, ocorrendo normalmente no último trimestre de gestação. Esse fato foi constatado em uma das propriedades trabalhadas, onde animais aparentemente sadios abortaram no terço final da gestação, após surto de

leptospiroses. Este fez aumentar a taxa de abortos no ano em relação à dos anos anteriores. As suspeitas de que os abortos foram provocados pelas *leptospiras sp* aumentaram com a obtenção dos resultados dos testes sorológicos. Eles revelaram que a maior parte dos animais apresentaram títulos elevados para *leptospira sp*, demonstrando a presença ativa da doença. Frente a essa situação, optou-se pelo tratamento de todas as fêmeas prenhes, na tentativa de diminuir os prejuízos e impedir os abortos. Os resultados foram eficientes, pois apenas duas das 56 vacas tratadas que ainda não tinham parido, abortaram, o que comprova que as *leptospiras sp* foram as responsáveis pelo surto de abortos ocorridos na propriedade, tendo participação efetiva nos problemas reprodutivos do rebanho.

Considerando-se só as leptospiroses (Tabela 8) e ignorando as outras enfermidades, ainda assim a associação persistiu. Tais resultados sugerem a participação da enfermidade nas perdas reprodutivas ocorridas durante o período do estudo. A prática de vacinação dos rebanhos susceptíveis é uma sugestão válida para controle da doença. Porém é importante saber quais as sorovariedades estão presentes nos rebanhos e utilizar as vacinas com eficiência e que sejam capazes de diminuir os prejuízos causados pela doença. Isso é possível através de inquéritos sorológicos que, além de mostrarem as sorovariedades presentes, indicam a ocorrência de atividade viral nos rebanhos.

Os resultados gerais da associação entre a sorologia apresentada pelos animais e a ocorrência de abortos demonstram que os animais positivos para mais de uma enfermidade eram mais propensos a terem

problemas de abortos (Tabela 7). O grupo LA * IBR * LEP foi o de maior percentual de abortos (47,37%). Outro grupo que mostrou associação entre as duas variáveis foi o positivo para todas as enfermidades pesquisadas (LA * IBR * DVB * LEP). Estes resultados sugerem a participação de doenças infecciosas nas perdas reprodutivas provocadas por aborto de bovinos de Minas Gerais e reforça a necessidade de se adotarem políticas que visem diminuir os problemas causados pelos agentes.

5 CONCLUSÕES

A presente pesquisa permite as seguintes conclusões:

- As cinco infecções estudadas estão presentes nos rebanhos trabalhados e sua distribuição não é uniforme. No entanto existe associação delas com os episódios de abortos.
- As doenças infecciosas estudadas apresentam maior relação com aborto, quando aparecem associadas em um mesmo animal, por isso nesse tipo de estudo, os inquéritos sorológicos devem ser realizados para vários agentes.
- Dentre as doenças estudadas as leptospiroses demonstraram maior associação entre sorologia positiva e aborto.
- Repetições de cio não demonstraram associação com a sorologia positiva nas doenças estudadas.
- Sorologia é uma ferramenta importante no diagnóstico de doenças, no entanto não é definitivo e necessita de outras técnicas mais precisas como isolamento, PCR, entre outras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V. L. *Prevalência de bovidos reagentes a prova de imunodifusão para Língua Azul na Região Norte do Brasil*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1982, 45p. (Tese de Mestrado).
- ADURIZ, G.; ATXAERANDIO, R.; MORENO, B. Diagnóstico laboratorial del aborto bovino. *Rev. Albertar*, n. 50, Novembro 2001.
- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. *Rev. Bras. Biol.*, v. 38, n.4, p.919-920, 1978.
- ALMEIDA, L.P.; REIS, D.O. Brucelose e bursite cervical em bovinos: uma revisão. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 21, n. 4, 1999.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D. et al. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, 1988.
- BACKER, J. C. Bovine viral diarrhoea virus : A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.190, n.11, p. 1449-1458, 1987.
- BARBOSA, E.F. Diagnóstico da diarréia bovina a vírus. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.4, p.508-514, 1999.
- BITSCH, V.; RONSHOLD, L. Control of bovine viral diarrhoea infection without application of vaccines. *Vet. Clin. North Am.*, v.11, n.3, p. 627-640, 1995.
- BOLIN, S.R. Control of bovine virus diarrhoea virus by use of vaccination. *Vet. Clin. North Am.*, v.11, n.3, p. 615-625, 1995.
- BOWMAN, F. Estresse Calórico. Boletim Semenzoo. Tecnologia em carne e leite *Rev. Pardo-Suíço*. Ano XII. N. 52. jan/fev, 2002.
- BRAUN, U., LANDOLT, G., BRUNNER, D. Epidemiologische Untersuchungen Über das Vorkommen von DVB/MD bei 2892 Rindern in 95 Milchviehtriben.. *Arch. Tierheilkd.*, v. 139, p.172-176, 1997.
- BROD, C. S.; MARTINS, L. F. S.; NUSSBAUM, J. R et al. Leptospiroses bovina na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. *Hora Vet.*, v. 14, p. 15-20, 1994.
- CAMPBELL, C. H.; GRUBMAN, M. J. Current knowledge on the biochemistry and immunology of bluetongue. In: PANDEY, R. *Infection and immunity in farm animals*. Basel, Karger, 1985. p. 58-79.
- CAMPBELL, C.H., GROOCOCK, C.M. Detection of bluetongue virus and antibodies in animals for importation into the United States. *Arbovirus Research in Australia*, 1982,p. 75-81.
- CANANT, J.C. Diagnosis of the cause of bovine abortion. part 1. *Mod. Vet. Pract.*, v.65, n. 12, p. 929-931, 1984.
- CANANT, J.C. Diagnosis of the cause of bovine abortion. part 2. *Mod. Vet. Pract.*, v.66, n. 1, p. 47-50, 1985.
- CASTRO, R. S. *Desempenho reprodutivo até 60 dias de gestação em doadoras de embriões bovinos frente a infecção por Diarréia bovina vírus, herpes vírus bovino 1, leucose e Língua Azul em Minas Gerais*. Belo Horizonte. Escola de Veterinária-UFMG, 1988.,93p. Dissertação (Dissertação de mestrado).
- CASTRO, R. S., LEITE, R.C., ABREU, J.J. et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.24, n.3, p.173-176, 1992.
- COLE, J. R., SULZER, C.R., PURSELL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Microbiology*. v 25, n. 6, p. 976 – 980, 1973.

- COSTA, J. R. R. *Língua Azul: produção e padronização de antígeno para prova de imunodifusão em gel de agar e prevalência nas mesorregiões sudoeste e sudeste do Estado do Rio Grande do Sul, 1999*. Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2000. (Dissertação de Mestrado).
- CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M., TEIXEIRA, A. C. Anticorpos precipitantes para o vírus da Língua Azul em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Biológico*, v.48, p.99-103, 1982.
- CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M., TEIXEIRA, A.C. Incidência de anticorpos para o vírus da Língua Azul em soros de caprinos e ovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Flum. Med. Vet.*, v.3, n.2, p. 53-56, 1988.
- CUNHA, A.S.; GONTIJO, M.M. Emulsões múltiplas: potenciais adjuvantes no desenvolvimento de medicamentos, vacinas e cosméticos. *Pharmac. Technol. Brasil*, v.5, n.5. p. 62-65, 2000.
- DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; DOBSON, H. *et al.* Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection. *Vet Rec.*, v. 3, p. 110-114, 1996.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L. *et al.* Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.201, p.709-713, 1992.
- DURHAM, P.J.K.; HOWARD, E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle of Saskatchewan and Alberta. *Can Vet. J.*, v. 31, p.815-820, 1990.
- ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. of North Am.: Food Animal Practice*. v.10, n.3, p. 463-479, 1994.
- FAINE, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*, World Health Organization. Who offset publication, 67. Geneva, 1982, 171 p.
- FERNANDES, C.A.C. *Infecções uterinas em bovinos*. (Parte 1 e 2), 2001. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/bn/> (30/11/2001).
- FERREIRA, A. M. *Manejo reprodutivo e sua importância na eficiência da atividade leiteira*. EMBRAPA (C.N.P.G.L.) Documento 46, p.47. Coronel Pacheco, MG. 1991.
- FLORES, E.F. Diarréia viral bovina (DVB). *Anais..... do IV simpósio Pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos*. Lavras, março-abril de 2000. p.15-22.
- FRASER, C. M. *Manual merck de veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento e controle de doenças para o veterinário*. 7 ed. São Paulo : Roca, 1996.
- GALVÃO, C.L., DÓRIA, J.D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos do Brasil. *Bol. Inst. Biol. Bahia*, v.6, n.1, p.15-25, 1962-1963.
- GIBBS, E.P.J. e RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpes virus. Part I. Bovine herpes virus 1. *Vet. Bull.*, Farnham Royal, v.47, n.5, p. 317 -343, 1977.
- GIBBS, E.P.J.; GREINER, E. C. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease In: *The Arbovirus Epidemiology and Ecology*. Flórida: T.P. Mpnath Ed, CRC Press Inc, v.3,p.39-70,1988.
- GUITIÁN, J.; GARCIA, F. J.; OLIVEIRA, et al. Infertilidad y mortalidad fetal en la especie bovina: el papel de leptospira interrogans serovar hardjo. *Med. Vet.*, v.16, n.6, p. 311-317, 1999.
- GUY, S. J.; POTGIETER, L. N. D. Bovine herpesvirus -1 infection of cattle kinetics of antibody formation of intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, n.4, p. 893-898, 1985.

- HERRMANN, G.P. *Leptospira sp em ovinos do Rio Grande do Sul: Soroprevalência e avaliação da imunogenicidade da bacterina L. hardjo*. Tese (Doutorado). Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2002
- HORRIGANS, J.L., KLINGSPORN, A.L. Epizootiology of bluetongue. The situation in the United States of America. *Aus. Vet. J.*, v.51, p. 203-208, 1975.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Censo Agropecuário e Pesquisa Da Pecuária Municipal*, 2001. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br>, 05/03/2003.
- JOCHIM, M.M.; CHOW, T.L. Immunodiffusion of bluetongue. *Am. J. Vet. Res.*, v.30, p.33-41, 1969.
- JULIANO, R.S.; CHAVES, N.S.T.; SANTOS, C.A. *et al.* Prevalência e aspectos epidemiológicos da Leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia-GO. *Ciênc. Rural*, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000.
- KIRKBRIDE, C.A. Managing an outbreak of livestock-2: diagnosis and control of bovine abortion. *Vet. Med.*, v.80, n.5, p.70-79, 1985.
- LEITE, R.C. Controle da diarreia bovina a vírus (DBV) e rinotraqueite infecciosa bovina (IBR). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.23, n.4, p.531-535, 1999.
- LEITE, R. C. Manejo Sanitário dos Bovinos. In: I Encontro Integrado de Médicos Veterinários da Zona da Mata-Mg. I Simpósio de Manejo Sanitário e Reprodutivo de Bovinos, 2000, Juiz de Fora. *Anais.....* Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 83p
- LEMO, R.A.A. Diarreia viral bovina. In: LEMO, R.A.A. *Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul*. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1998. Cap. III, p. 226-258.
- LILENBAUM, W.; SANTOS, M. R. C. Leptospirosis in animal reproduction. III. The role of serovar *hardjo* in bovine Leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Latinoam. de Microbiol.*, v. 37, n.2, p.87-92, 1995.
- LOBATO, Z. I. P. *Vírus de Língua Azul: construção de recombinantes em vírus vaccinia e resposta imune*. Tese (Doutorado). Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1996. 200p.
- LOBATO, Z. I. P. Língua Azul: a doença nos bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23 n. 4 p. 515 - 523, 1999.
- LOBATO, Z. I. P. Diarreia Bovina à Vírus. In : I Encontro Integrado de Médicos Veterinários da Zona da Mata-Mg. I Simpósio de Manejo Sanitário e Reprodutivo de Bovinos, 2000, Juiz de Fora. *Anais.....* Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000.83p
- LOEFFLER, S.H.; SCHUKKEN, Y.H.; DE VRIES, M.J. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.82, n.12, p.2589-2604, 1999.
- LYAKU, J. R. S.; NETTLETON. P. F. MSOLLA. P. M. et al. Prevalence of antibody to bovine herpesvirus-1 (HVB-1) in Tanzanian cattle. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v.23, p. 106-107, 1991.
- MELO, C. B.; AZEVEDO, E. O.; ALFARO, C. E. P. et al. *Prevalência de anticorpos contra o herpesvírus bovino-1 (HVB-1) em bovinos do sertão da Paraíba*, Brasil, 1998.
- MELO, C.B. *Distribuição de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino 1 (HVB-1) em rebanhos de aptidão leiteira e de corte do Estado de Minas Gerais*: Dissertação (Mestrado). Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1998. 82p.
- MILLER, N.J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. *J. Am. Vet. Assoc.* v.126, n.4, p.463-467, 1955.

- MILLER, J. M.; VAN DER MARTIN. M. J. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infections during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 223-228, 1986.
- MILLER, D.A.; WILSON, M.A.; BERAB, G.W. Survey to estimate prevalence of leptospira interrogans infection in mature cattle in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, v. 52, n. 11, p.1761-1768, 1991.
- MILLER, J.M., The effect of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Vet. Med.*, v. 86. n.1, p. 95-98, 1991.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2001. *Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose bovina (PNCEBT)*. 30/10/2001. <<http://www.agricultura.gov.br/das/dda/propostas.htm>>.
- MOENING, V.B.; LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am.*: Food Animal Practice. p. 477-487, 1995.
- MOREIRA, E. C., SILVA, J. A., VIANA, F. C. *Teste de imunodifusão de Língua Azul em bovinos de alguns municípios do Brasil*. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 9, 1980, Belo Horizonte. Belo Horizonte: Núcleo de Assessoramento à Pesquisa, 1980. p.83.
- MOREIRA, E.C. *Avaliação de métodos para erradicação de Leptospiroses em bovinos de leiteiros*. Belo Horizonte, MG. 110 p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, UFMG, 1994.
- MSOLLA, P.M.; WISEMAN, E.M.; SELMAN, I.E. A comparison of the virulence of three strains of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet. Microbiol.*, v.8., p. 129-134, 1983.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for diagnostic test and vaccines*. (O I.E.). Paris, France. 2 ed. 783 p., 1992.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Código Zoosanitário Internacional*, 1999, Cap.2.1.9
- OIRSCHOT, J.T.; BRUSCHKE, C.J.M.; RIJN, P.A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microbiol.*, v.64, p. 169-183, 1999.
- OSBURN, B. I. ; *Role of the immune system in bluetongue host viral interactions*, separata de Bluetongue and related orbiviruses, s.d. Alan R. Liss. Inc., 1985. p. 417-422.
- PEARSON, J. E., JOCHIM, M.M. Protocol of the immunodiffusion test for bluetongue. 22.ed. *American Association Veterinary Diagnosticians*, 1979. p.463-471: Annual Proceedings
- PITUCO, E.M. *Ocorrência da rinotraqueite infecciosa dos bovinos/Vulvovaginites Pustular Infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos criados nos Estados de São Paulo, Rio grande do Sul, Paraná, Minas Gerais*. Tese (Mestrado), FMVZ-USP, São Paulo, 1988.
- POESTER, F.P. Brucelose animal. In: *Anais... do II Simpósio PFIZER sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos*. Caxambu, 1997.
- REED, L.J.; MÜNCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The Am. J. Hygien.*, v.27, n.3, p. 493-497, 1938.
- RWEYEMAMU, M.M.; FERNANDEZ, A.A.; ESPINOSA, A.M.; *et al.* Incidência epidemiológica y control de la diarrea viral bovina en América de Sur. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* v.9, n.1, p. 215-221, 1990.
- SILVA, J.A., MODENA, C.M., MORREIRA, E.C. *et al.* Freqüência de febre aftosa, Língua Azul, leucose enzoótica bovina em caprinos de diferentes sistemas de produção no Estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.40, n.6, p. 393-403, 1988.

TEDESCO, L.A. Leptospirose; uma doença que se expande e assusta. *Balde Branco*, São Paulo, v. 33. n. 395, p. 44-46, 1997.

THOEN, F.E. e CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: GYLES, C.L. e THOEN, C.O., *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Iowa State University, 1995, 236-247p.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINE JUNIOR, O.; UMEHARA, O et al. *Leptospirose bovina*. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, e Mato Grosso do Sul. Colheitas de janeiro a abril de 1996. Reunião Anual do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 1996.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospiroses bovina. In: *Anais... II Simpósio Pfizer Sobre Doenças Infecciosas e Vacinas Para Bovinos*. Caxambu, 1997, p. 34-38.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor*, p.51-58, 1974.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E. et al. Herpes Bovino tipo 1 (HVB-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciênc. Rural.*, v. 25. n. 3. p. 421-424, 1995.