

Juliana Marques Bicalho

**AGENTES INFECCIOSOS EM AMOSTRAS DE BIÓPSIA UTERINA DE
VACAS LEITEIRAS COM PROBLEMAS REPRODUTIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2015**

B583a Bicalho, Juliana Marques, 1990-
Agentes infecciosos em amostras de biópsia uterina de vacas leiteiras com problemas reprodutivos / Juliana Marques Bicalho. – 2015.
56 p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

I. Vaca – Reprodução – Teses. 2. Vaca – Doenças – Teses. 3. Útero – Biópsia – Teses.
4. Sorologia veterinária – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 26

FOLHA DE APROVAÇÃO

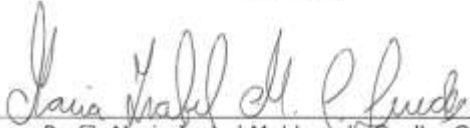
JULIANA MARQUES BICALHO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente - Orientador


Dr. Luciano Bastos Lopes
EMBRAPA


Prof.ª Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho aos meus pais Alzira e Antônio Sérgio e ao meu irmão Rodrigo, pela dedicação, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu saúde e serenidade para vencer obstáculos impostos e concluir este trabalho com êxito.

Aos meus pais que, mesmo sem as vezes entender, me apoiaram durante todo o mestrado. Ao Rodrigo por sempre torcer pelo meu sucesso.

Ao orientador Prof. Rômulo Leite pelos ensinamentos, oportunidade e confiança depositada durante toda a execução deste trabalho. Ao coorientador Prof. Jenner K. Pimenta dos Reis pelos acompanhamentos e por me acrescentar conhecimento além do médico-veterinário. Ao coorientador Prof. Felipe Masiero Salvarani por corrigir prontamente meu projeto de mestrado.

Às fazendas participantes e funcionários pela colaboração e por disponibilizar os animais e os dados zootécnicos, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos que auxiliaram intensamente na realização das coletas à campo: André Oliveira, Beatriz Parzewski, Cairo Henrique, Cláudia Fideles, Daniel Sobreira, Gilmar Alvim, Jaci de Oliveira e Telissa Kassar. Ao Prof. Alan Maia Borges e à Telma Martins pelo material emprestado e por terem me ensinado como realizar a técnica de biópsia uterina.

Ao Prof. Anilton César de Vasconcelos por ter auxiliado na realização da histologia deste trabalho. Ao Prof. Marcos Xavier por auxiliar na análise estatística dos dados.

Ao Antônio Augusto Fonseca Júnior pela orientação fundamental no planejamento e execução das técnicas de biologia molecular deste trabalho. Em conjunto à Ana Cláudia Cottorello, Pedro Motta e ao Ricardo Aurélio por permitirem que esse trabalho fosse realizado no Laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO-MG. A todos os bolsistas do LBM, pela ajuda no meu treinamento e execução do experimento, especialmente à Ana Paula Rodrigues, Eduardo Lara, Lívia Orzil, Marcela Gasparini, Michele Freitas, Natália Mendes e Nayara Lima.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Agda Leite, André Almeida, Eduardo Nunes, Graciela Kunrath e Grazielle Cossenzo - pela ajuda na execução das técnicas, carinho e dedicação com todos os pós-graduandos que passam pelo departamento.

À Prof. Solage Maria Gennari e ao Prof. Marcelo Bahia Labruna, da Universidade de São Paulo, por cederem uma alíquota de taquizoítos e realizarem prontamente o diagnóstico sorológico para *N. caninum*. Ao Prof. Rinaldo Aparecido Mota, da Universidade Federal Rural do Pernambuco, por também ceder uma amostra de taquizoítos de *N. caninum*. Ao Prof. Carlos Leal e ao Prof. Henrique Figueiredo por permitirem que o sequenciamento fosse realizado no AQUACEN, e ao pesquisador Alex Fiorini por ter executado a técnica. À Camila Martins pelo auxílio na realização das clonagens do trabalho.

A todos os membros do Retrolab pela ajuda e por serem, além de colegas de trabalho, uma família. Obrigada pela ajuda, aprendizado, conselhos e por tornarem os momentos difíceis mais leves, pelo fato de estarmos juntos: Agda Leite, Ana Paula Rodrigues, Ana Carolina Nicoletti, Cairo Oliveira, Camila Martins, Cláudia Fideles, Fernanda Oliveira, Grazielle Cossenzo, Isabela Abreu, João Helder, Luciana Dias, Stefanne Gonçalves e Telissa Kassar. Em especial, agradeço imensamente ao André Penido e Paula Pires por terem me “roubado” e apadrinhado desde a época da graduação. Vocês com certeza possuem uma grande contribuição para esta minha conquista.

Aos amigos pelo carinho, torcida, diversão e amizade sincera: Beth Cardinali, Hariany Seabra, Isabela Carla, Isabela Lanza, Joana Rodrigues e Vanessa Stuart. Aos amigos, confidentes e também companheiros das agradáveis idas ao Restaurante Universitário: Amanda Diniz, Carlos.

Ao Matheus Serafini, por mesmo no final da caminhada ter feito com que tudo fosse mais fácil. Obrigada pelo carinho e companheirismo que me deram forças nos momentos difíceis.

Ao Samuel Lucas por estar ao meu lado sempre, e apesar de primos, termos o carinho de irmãos. Ao Gabriel Zocrato por proporcionar momentos agradáveis seja como primo, músico, ator ou guia das cachoeiras do Tangará.

A todos os colegas da pós-graduação, funcionários e professores da Escola de Veterinária da UFMG por, desde 2008, ser com orgulho a minha segunda casa.

À Fazenda Modelo da UFMG por abrir as portas para mim desde a graduação até a execução deste trabalho. À EMBRAPA Gado de Leite e EPAMIG pela parceria.

Ao CNPq, INCT-Pecuária, CAPES E FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

“O que vale na vida não é o ponto de partida, e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.” – Cora Coralina.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS	12
	RESUMO	13
1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	PERDAS GESTACIONAIS EM VACAS LEITEIRAS.....	14
3.2	AGENTES INFECCIOSOS.....	15
3.2.1	Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).....	15
3.2.2	Vírus da Diarreia bovina viral (BVDV).....	16
3.2.3	Vírus da Leucemia Bovina (BLV).....	17
3.2.4	Vírus da Língua Azul (BTV).....	17
3.2.5	<i>Leptospira interrogans</i>	18
3.2.6	<i>Escherichia coli</i>	19
3.2.7	<i>Campylobacter fetus</i>	19
3.2.8	<i>Tritrichomonas foetus</i>	20
3.2.9	<i>Neospora caninum</i>	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	LOCAL E ANIMAIS.....	21
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	22
4.3	COLETA DE SANGUE.....	22
4.4	TESTES SOROLÓGICOS.....	23
4.4.1	Soroneutralização para diagnóstico de BoHV-1 e BVDV.....	23
4.4.2	Imunodifusão em gel de Ágar para diagnóstico de BLV e BTV.....	23
4.4.3	Aglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose.....	23
4.4.4	Imunofluorescência indireta para diagnóstico de Neosporose.....	24
4.5	EXAME GINECOLÓGICO E BIÓPSIA UTERINA.....	24
4.6	HISTOLOGIA DA BIÓPSIA UTERINA.....	24
4.7	EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO.....	24
4.8	PCR PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DE DNA.....	25
4.9	PCR PARA DETECÇÃO DOS AGENTES EM TECIDO UTERINO.....	25
4.9.1	PCR tempo real para BoHV-1, <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Leptospira interrogans</i>	25
4.9.2	PCR tempo real para <i>Campylobacter fetus</i>	26
4.9.3	Nested PCR para detecção do BLV e PCR convencional para <i>Escherichia coli</i>	26
4.9.4	PCR tempo real para detecção de <i>Neospora caninum</i>	27
4.9.5	RT-qPCR para detecção de BTV e BVDV.....	27
4.10	CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	27
4.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
5.	RESULTADOS	28
5.1	HISTOLOGIA DA BIÓPSIA UTERINA.....	28
5.2	EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DE DNA.....	28
5.3	FREQUÊNCIA DE ANIMAIS SOROLOGICAMENTE POSITIVOS ENTRE AS PROPRIEDADES.....	29
5.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE SOROLOGIA E OCORRÊNCIA DE PROBLEMA REPRODUTIVO.....	30
5.5	ASSOCIAÇÃO ENTRE OS AGENTES INFECCIOSOS NO TECIDO UTERINO E A OCORRÊNCIA DE PROBLEMA REPRODUTIVO.....	31
5.6	DETECÇÃO DO AGENTE NO TECIDO UTERINO E PRESENÇA DE CORPO LÚTEO OVARIANO.....	33
6.	DISCUSSÃO	33
6.1	BoHV-1.....	33
6.2	BVDV.....	34
6.3	BLV.....	34

6.4	BTV.....	35
6.5	<i>Leptospira interrogans</i>	36
6.6	<i>Escherichia coli</i>	37
6.7	<i>Campylobacter fetus</i>	37
6.8	<i>Tritrichomonas foetus</i>	37
6.9	<i>Neospora caninum</i>	37
DETECÇÃO DO AGENTE NO TECIDO UTERINO E PRESENÇA DE CORPO		
6.10	LÚTEO OVARIANO.....	38
7.	CONCLUSÕES	38
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
9.	ANEXOS	53
ANEXO 1: CERTIFICADO DO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE		
9.1	ANIMAIS/UFGM.....	53
9.2	ANEXO 2: INFORMAÇÕES SOBRE OS INICIADORES.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos animais de acordo com o grupo experimental, propriedade e problema reprodutivo.....	22
Tabela 2 -	Sorogrupo, sorovares e amostras de referências utilizadas para diagnóstico sorológico de <i>Leptospira interrogans</i>	24
Tabela 3 -	Descrição das técnicas de PCR utilizadas como controle da extração de DNA.....	25
Tabela 4 -	Condições das reações de PCR para detecção do DNA de BoHV-1, <i>Tritrichomonas foetus</i> , <i>Leptospira interrogans</i> em amostras de tecido uterino.....	25
Tabela 5 -	Condições da reação de PCR para detecção do DNA de <i>Campylobacter fetus</i> em amostras de tecido uterino.....	26
Tabela 6 -	Reação de PCR utilizada para detecção do DNA proviral de BLV em amostras de tecido uterino.....	26
Tabela 7 -	Condições da reação de PCR para detecção do DNA de <i>Escherichia coli</i> em amostras de tecido uterino.....	27
Tabela 8 -	Reação de PCR utilizada para detecção do DNA de <i>Neospora caninum</i> em amostras de tecido uterino.....	27
Tabela 9 -	Reações de PCR utilizadas para detecção dos RNA virais de BTV e BVDV em amostras de tecido uterino.....	27
Tabela 10-	Ocorrência de animais sorologicamente positivos para BoHV-1, BVDV, BLV, BTV e <i>Neospora caninum</i> por propriedade.....	29
Tabela 11-	Ocorrência de animais sorologicamente positivos para a sorovariedade <i>hardjo</i> de <i>Leptospira interrogans</i> por propriedade.....	29
Tabela 12-	Ocorrência de animais sorologicamente positivos para as sorovariedades <i>bratislava</i> , <i>wolffi</i> , <i>hebdomadis</i> , <i>pomona</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i> por propriedade.....	30
Tabela 13-	Distribuição de resultados positivos nas sorologias para BoHV-1, BVDV, BTV e <i>Neospora caninum</i> por grupo experimental.....	30

Tabela 14-	Distribuição de resultados positivos nas sorologias para as sorovariedades de <i>Leptospira interrogans</i> por grupo experimental.....	30
Tabela 15-	Ocorrência do material genético de BLV, <i>T. foetus</i> e <i>E. coli</i> no tecido uterino por grupo experimental.....	32
Tabela 16-	Comparação entre os resultados da sorologia e PCR em tecido uterino de BLV.....	32
Tabela 17-	Relação entre detecção do agente infeccioso no tecido uterino e presença de corpo lúteo ovariano.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Histologia de amostra de biópsia uterina. a: Endométrio uterino, apresentando tecido conjuntivo frouxo e algumas glândulas endometriais b: Miométrio com células musculares lisas c: Perimétrio composto por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos abundantes (Coloração Hematoxilina- Eosina 100X).....	28
Figura 2 -	Curvas de amplificação de DNA para o gene beta – actina. As linhas sem amplificação são os controles negativos da reação.....	28
Figura 3 -	Eletoforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene normalizador GAPDH em amostras de biópsia uterina. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100pb); canaleta; 2: Controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaleta 4-9: amostras de DNA uterino.	29
Figura 4 -	Curvas de amplificação de BoHV-1 (a); BVDV (b); BTV (c); <i>Neospora caninum</i> (d); <i>Leptospira interrogans</i> (e). Curva de <i>melting</i> de <i>C. fetus</i> (e). As curvas demonstradas nos gráficos são os controles positivos utilizados nas reações.....	31
Figura 5 -	Eletoforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do DNA proviral de BLV em amostras de biópsia uterina. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: Controle positivo, canaleta 3: controle negativo, canaleta 4-20: amostras de DNA uterino.....	32
Figura 6 -	Curvas de amplificação de DNA de <i>Tritrichomonas foetus</i> em amostras de biópsia uterina.....	32
Figura 7 -	Eletoforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do DNA de <i>Escherichia coli</i> em amostras de biópsia uterina. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: Controle positivo, canaleta 3: controle negativo, canaleta 4-20: amostras de DNA uterino.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BLV: Vírus da Leucemia Bovina
BoHV-1: Hespévirus Bovino tipo 1
BTV: Vírus da Língua Azul (Bluetongue virus)
BVDV: Vírus da diarreia bovina viral
cpBVDV: Amostras de BVDV citopatogências
DMSO: dimetilulfóxido
EBL: Leucose Enzoótica Bovina
FLK: Linhagem contínua de células de rim de feto de cordeiro
IATF: Inseminação artificial em tempo fixo
IDGA: Imunodifusão em Gel de Ágar
IF: Iniciador *forward*
IFR: Iniciadores *forward* e *reverse* na reação
IR: Iniciador *reverse*
LANAGRO/MG: Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
MDBK: Linhagem contínua de células de rim de bovino
MEM: Meio essencial mínimo
MN: NEOTAQMaster Mix Kit (Ampliqon)
MP: Precision 2X qPCR Mastermix (Primer Design)
NaCl: Cloreto de Sódio
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
ncpBVDV: Amostras de BVDV não citopatogências
OIE: World Organisation for Animal Health
PCR: Reação em cadeia da Polimerase
PI: Persistentemente infectados
qPCR: PCR quantitativa
RT-PCR: PCR com transcrição reversa
RT-qPCR: PCR quantitativa com transcrição reversa
SH: sondas de hidrólise
TCID₅₀: Dose infectante para 50% da cultura de tecido
TG: GoTaq® Flexi Buffer (Promega)
T_m: Temperatura de *melting*
TP: Go Taq® DNA Polymerase (Promega)
UEL: Universidade Estadual de Londrina
USP: Universidade Estadual de São Paulo
VERO: Linhagem contínua de células de rim de macaco verde

RESUMO

Os agentes infecciosos são importantes fatores envolvidos na ocorrência de falhas reprodutivas nos rebanhos leiteiros. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a soropositividade e a detecção do material genético dos agentes Herpesvirus Bovino tipo 1, Vírus da Diarreia bovina Viral, Vírus da Língua Azul, Vírus da Leucemia bovina, *Leptospira interrogans*, *Neospora caninum*, *Escherichia coli*, *Campylobacter fetus subsp venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em amostras de biópsia uterina de animais com histórico de abortos, natimortos e repetição de cio (n=23) e em animais sem histórico de problema reprodutivo (n=23), provenientes de três rebanhos leiteiros de Minas Gerais. Foi detectado em amostras de biópsia uterina o DNA de BLV em 52,17% e de *E. coli* em 28,26% das amostras, sem associação com a ocorrência de problema reprodutivo. A detecção de *Tritrichomonas foetus* foi considerada inespecífica e não foram detectados no útero os demais agentes pesquisados. Conclui-se que outros fatores não infecciosos poderiam desempenhar papel importante na ocorrência de problemas reprodutivos em vacas leiteiras.

Palavras-chave: Bovinos, problemas reprodutivos, agentes infecciosos, sorologia, PCR, biópsia, útero.

ABSTRACT

Infectious agents are important factors involved in the occurrence of reproductive failure in dairy herds. The objective of this study was to evaluate the relationship between soropositivity and detection of genetic material of the agents Bovine herpesvirus type 1, Bovine viral diarrhea virus, Bluetongue virus, Bovine Leukemia virus, Leptospira interrogans, Neospora caninum, Escherichia coli, Campylobacter fetus subsp venerealis and Tritrichomonas foetus in samples of uterine biopsy of animals with a history of abortion, stillbirths and repeated breeding (n = 23) and in animals with no problems related to reproductive history (n = 23) in three dairy herds from Minas Gerais. DNA of BLV and of E. coli was detected in 52,17% and 28,26%, respectively, in uterine biopsy samples, with no association with the occurrence of reproductive problems. The detection of Tritrichomonas foetus was considered nonspecific and the other agents studied were not detected in the uterus samples. In conclusion, other non-infectious factors may play a role in the occurrence of reproductive problems in dairy cows.

Keywords: Cattle, reproductive problems, infectious agents, serology, PCR, biopsy, uterus.

1. INTRODUÇÃO

Em 2012, o Brasil produziu aproximadamente 32 bilhões de litros de leite e foi considerado o terceiro maior produtor mundial. No entanto, a pecuária leiteira brasileira ainda é considerada de baixa produtividade e, além dos fatores genéticos e nutricionais, a ineficiência reprodutiva é considerada o fator que possui maior impacto na produtividade de um rebanho. Propriedades que apresentam intervalo entre partos elevado, muito superior a 365 dias, apresentam redução do número de vacas em produção, aumento do número de vacas secas, diminuição do nascimento de bezerras para a reposição e prejuízo no melhoramento genético do rebanho.

As perdas gestacionais são consideradas um dos fatores que mais contribuem para a ineficiência reprodutiva. Quando no início da gestação, decorrem em absorção embrionária e retorno ao cio e quando tardias, levam a ocorrência de abortos, natimortos e partos distócicos. As causas são multifatoriais e podem ocorrer devido a problemas nutricionais, genéticos, endócrinos ou infecciosos.

As causas infecciosas são frequentemente associadas às perdas reprodutivas e são consideradas importantes por serem capazes de atingir um grande número de animais e permanecer no rebanho ao longo das gerações. Alguns agentes infecciosos são recorrentemente alvos de estudos que investigam sua capacidade de interferirem no desempenho reprodutivo dos bovinos, como o Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), Vírus da diarreia bovina viral (BVDV), Vírus da Língua Azul (BTV), Vírus da Leucemia Bovina (BLV), *Leptospira interrogans*, *Escherichia coli*, *Campylobacter fetus subsp. venerealis*, *Neospora caninum* e *Tritrichomonas foetus*. No entanto, a influência da soropositividade na ocorrência de falhas reprodutivas apresenta resultados conflitantes entre os trabalhos. Além disso, não se sabe se animais soropositivos para determinado agente podem apresentar o mesmo no útero, e isto implicar em perdas embrionárias e fetais recorrentes.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a soropositividade para alguns agentes infecciosos em três rebanhos leiteiros de Minas Gerais; verificar a relação entre soropositividade e ocorrência de problema reprodutivo além de investigar a presença do agente infeccioso no tecido uterino e sua possível relação com a ocorrência de distúrbio reprodutivo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Perdas gestacionais em vacas leiteiras

A eficiência reprodutiva é considerada o fator que, isoladamente, mais afeta a produtividade e lucratividade de um rebanho, porém, existem muitos obstáculos para otimizá-la, pois podem ocorrer falhas reprodutivas desde a concepção até o parto (Bergamashi *et. al*, 2010).

As falhas na fertilização - em condições corretas de manejo durante a cobertura e utilização de sêmen/touro fértil - não são consideradas fatores importantes para ineficiência reprodutiva, pois a taxa de fertilização é na maioria dos casos elevada (em torno de 80%), podendo ser alterada em casos de anormalidades espermiáticas, estresse térmico e oócitos de má-qualidade (Diskin *et. al*, 2008; Sartori *et. al*, 2010).

As perdas gestacionais são consideradas as maiores causas de falhas reprodutivas em rebanhos bovinos (Ayalon, 1978). A mortalidade embrionária ocorre desde a fertilização até o 24º dia de gestação com frequência entre 20 a 40% das concepções, podendo ser dividida em mortalidade embrionária muito precoce (até o sétimo dia de gestação) e precoce (do sétimo ao vigésimo quarto dia). Oócitos de má qualidade e microambiente tubárico inadequado são causas de mortalidade na primeira semana, pois as células do oviduto fornecem nutrientes (íons, aminoácidos e glicose) e fatores de crescimento (IGF-I e IGF-II) para o desenvolvimento do zigoto (Humblot, 2001; Robinson *et. al*, 2008; Walsh *et. al*, 2011). A mortalidade embrionária precoce ocorre principalmente devido a um inadequado microambiente uterino,

pois a partir do 7º dia, o blastocisto desenvolve prolongamentos que ocuparão todo o corno uterino (Rizos *et. al.*, 2002). As causas de mortalidade são difíceis de serem determinadas, podendo ocorrer por alterações endócrinas, genéticas, metabólicas ou infecciosas e resultam no retorno da vaca ao cio em intervalo normal (Walsh *et. al.*, 2011). Animais sem alteração clínica que falham em conceber recorrentemente, necessitando de três ou mais inseminações/coberturas com sêmen sabidamente fértil, são chamadas de fêmeas repetidoras de cio (*repeat breeder cow*) (Singh *et. al.*, 2000).

A mortalidade embrionária tardia ocorre entre o 25º e 45º dia, período em que a diferenciação embrionária está completa, e a mortalidade fetal ocorre do 46º dia até o parto, sendo que ambas ocorrem em menor frequência (8 a 17,5%) (Humblot, 2001; Walsh *et. al.*, 2011). As perdas embrionárias tardia e fetais resultam normalmente em absorção embrionária ou aborto, este último é a expulsão do feto entre 42 dias e 280 dias de gestação, com incompatibilidade de sobrevivência extra-uterina (Givens *et. al.*, 2008; Juffo, 2010). Os fatores causadores de perda embrionária tardia e fetal podem ser genéticos, endócrinos ou infecciosos (Diskin *et. al.*, 2008). Os agentes infecciosos podem ser bactérias, vírus, fungos e protozoários que atuam diretamente (agente ou toxinas) sobre o feto ou indiretamente, causando placentite e perda gestacional. As causas de aborto são difíceis de serem estabelecidas, pois o feto abortado normalmente sofre autólise 24 a 48 horas após aborto e muitas afecções não apresentam lesões fetais patognomônicas (Anderson, 2007; Givens *et. al.*, 2008). Em um estudo realizado na Califórnia, analisando 595 fetos abortados, as causas infecciosas ocorreram em 37,1% dos fetos, sendo que 18,0% eram causados por bactérias, 14,6% protozoários e 3,2% por vírus – e as não infecciosas 5,5%. Entretanto a maior parte (57,3%) dos casos de aborto apresentou etiologia indeterminada. (Jamaluddin *et. al.*, 1996). O natimorto é definido como o bezerro a termo que morre antes, durante ou 12 a 48 horas após o parto. A natimortalidade tem causa multifatorial, podendo ocorrer devido às distocias ou por agentes infecciosos (Berglund *et. al.*, 2003).

3.2 Agentes infecciosos

3.2.1 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

O BoHV-1 é um vírus envelopado contendo DNA de fita dupla, pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*. O BoHV-1 infecta primariamente os bovinos, no entanto, outros ruminantes como caprinos, ovinos, bubalinos e camelos podem ser afetados. Assim como outros membros da subfamília, possui ciclo replicativo curto e capacidade de estabelecer latência em neurônios (Muylkens *et. al.*, 2007). São conhecidos três subtipos do BoHV-1: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b, sendo que o subtipo 1.1 normalmente é isolado em afecções respiratórias e em abortos e os subtipos 1.2 em lesões nas mucosas genitais. No entanto, a diferenciação de qual subtipo envolvido só pode ser detectado através de endonucleases de restrição, pois já foi detectado envolvimento do subtipo BoHV-1.2 em afecções respiratórias naturais e experimentais (Meltzer *et. al.*, 1985; Meltzer, 1986; D'arce *et. al.*, 2002; Spilki, 2004).

Inquéritos sorológicos realizados em todo o Brasil têm demonstrado altos percentuais de animais soropositivos. Lima *et. al.* (2011), em um estudo abrangendo 21 estados brasileiros, detectou ocorrências que variaram de 27,27% no Rio Grande do Sul a 100% nos estados do Espírito Santo e Ceará. Em Minas Gerais, a ocorrência em amostras recebidas em laboratórios de diagnóstico foi 58,17% e 68% de animais positivos (Rocha *et. al.*, 2001; Lima *et. al.*, 2011). Em rebanhos leiteiros da Zona da Mata e Triângulo Mineiro as frequências relatadas são 49% e 80,15%, respectivamente (Mendes *et. al.*, 2009; Ferreira, 2012).

As portas de entrada naturais do vírus são as mucosas do trato respiratório e genital, podendo também ocorrer através de inoculação conjuntival (Muylkens *et. al.*, 2007). A transmissão ocorre pelo contato com a secreção nasal ou aerossol de um animal infectado que elimina o vírus por 10 a 14 dias, sendo que a sobrevivência viral ocorre principalmente em baixas temperaturas e alta umidade relativa (Gibbs *et. al.*, 1977; Nandi *et. al.*, 2009). A transmissão também pode ocorrer através das secreções genitais, fluidos fetais e sêmen, podendo resistir no sêmen congelado a -196°C por até um ano (Nandi *et. al.*, 2009). A replicação viral no trato respiratório leva a doença respiratória conhecida como Rinotraqueíte Infecciosa

Bovina (IBR), caracterizada por febre, anorexia, descarga nasal mucopurulenta, conjuntivite, dispneia, podendo evoluir até broncopneumonia severa e pleurite. A infecção genital leva ao desenvolvimento da Vulvovaginite pustular Infecciosa/ Balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB) com aparecimento de pústulas e úlceras na mucosa da vulva e prepúcio (Biswasa *et. al.*, 2013).

A infecção por BoHV-1 está relacionada a impactos na reprodução, e este vírus é considerado um dos mais importantes agentes abortivos dos bovinos (Ackermann *et. al.*, 2006). Experimentalmente, o aborto pode ocorrer em qualquer fase da gestação, entretanto, em condições naturais o mais comum é a ocorrência de abortos dos cinco aos oito meses de gestação (Ali *et. al.*, 2012). Os fetos abortados apresentam necrose de coagulação multifocal no fígado, rins, baço e linfonodo hepático associado à placentite necrótica (Rodger, 2007). O papel do BoHV-1 na fertilidade ainda não é bem estabelecido, mas acredita-se que o vírus possa interferir no desenvolvimento embrionário inicial devido às lesões no corpo lúteo ovariano (Miller, 1984; Miller, 1986, 1987; Bielanski, 2014), o que resultaria em aumento no número de inseminações por concepção e de dias em aberto nos animais sorologicamente positivos (Ara *et. al.*, 2006; Raaperi *et. al.*, 2012). Em outros trabalhos, entretanto, esse prejuízo no desempenho reprodutivo não foi relatado (Hage *et. al.*, 1998; Magaña-Urbina *et. al.*, 2005; Lassen *et. al.*, 2012).

3.2.2 Vírus da Diarreia Bovina Viral (BVDV)

O Vírus da Diarreia Bovina Viral (BVDV) é um membro do gênero *Pestivirus* e família *Flaviridae*, possuindo genoma composto por fita única de RNA senso positivo e afeta principalmente os bovinos (Fray *et. al.*, 2000b). O vírus é subdividido em dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2) e estes em diversos subgenótipos, de acordo com as diferenças antigênicas e genéticas (Vilcek *et. al.*, 2005). Além disso, há a classificação do biótipo baseada no efeito do vírus sobre monocamada celular: amostras citopatogênicas (cpBVDV) e não citopatogênicas (ncpBVDV). Na natureza, a ncpBVDV é predominante, mas a cpBVDV é a mais comumente isolada na doença das mucosas e pode ser resultado de mutações a partir de amostra não citopatogênica (Ridpath, 2005). Recentemente, identificou-se um novo pestivírus chamado “HoBi-like” ou “BVDV-3”, e possui alta semelhança antigênica e de manifestação clínica em relação à infecção pelo BVDV (Bauermann *et. al.*, 2013).

O vírus é transmitido através das secreções de animais infectados, aerossóis, moscas e fômites (Niskanen *et. al.*, 2003). Em vacas não prenhes, a infecção aguda por amostra ncpBVDV resulta em viremia transitória e imunidade após duas semanas, que de um modo geral é assintomática e autolimitante, com depressão, febre, inapetência, diarreia leve, leucopenia transitória (Meyling *et. al.*, 1990; Pedrera *et. al.*, 2011; Fino *et. al.*, 2012). Em vacas prenhes, o BVDV é capaz de infectar o feto, e caso a infecção pelo biótipo ncpBVDV ocorra entre o segundo e quarto mês de gestação, que é o período de desenvolvimento do sistema imune fetal, o bezerro nascerá persistentemente infectado (PI). Os animais PI desempenham papel crucial na disseminação do vírus no rebanho, por excretar continuamente grande quantidade de vírus aos outros animais, dentre eles, vacas gestantes que darão origem aos novos PI (Lindberg, 2005; Peterhans *et. al.*, 2010).

A infecção do BVDV durante a prenhez também pode resultar em morte embrionária com repetição de cio, aborto e natimorto (Grooms, 2004). Robert *et. al.* (2004) detectou que rebanhos com infecção recente ou não, apresentavam aumento na taxa de retorno ao cio. Rügenacht *et. al.* (2001) avaliou que o BVDV aumentou a taxa de morte fetal no período entre 46 e 210 dias de gestação em animais que soroconverteram durante o estudo e Waldner (2005) detectou que animais soropositivos para BVDV tipo 2 apresentavam 2,3 vezes maior chance de abortarem. Além disso, acredita-se que a infecção conjunta de BVDV e *Neospora caninum* ou BVDV e BoHV-1 possam favorecer a ocorrência de abortos, pelo imunossupressão advinda da infecção pelo BVDV (Biuk-Rudan *et. al.*, 1999; Björkman *et. al.*, 2003). Novilhas congenitamente infectadas apresentam retardo da primeira cobertura em até 42 dias, e as que se infectaram horizontalmente apresentam aumento de até 16 dias na data do primeiro parto (Valle *et. al.*, 2001; Muñoz-Zanzi *et. al.*, 2004).

No Brasil, diversos trabalhos comprovaram a circulação de BVDV em vários Estados e sua ampla difusão na população bovina (Fino *et. al.*, 2012). A ocorrência de animais soropositivos foi de 23,8% em um estudo utilizando 15 rebanhos leiteiros de Minas Gerais e 57,56% (141/215) vacas leiteiras do sul de

Minas Gerais (MELO, 2004; SAMARA, 2004). Mineo *et. al* (2006) detectou 62% de animais positivos em rebanhos leiteiros do Triângulo Mineiro.

3.2.3 Vírus da Leucemia Bovina (BLV)

O vírus da leucemia bovina (BLV) é um *Deltaretrovírus* pertencente à família *Retroviridae* e é o agente causador da leucose enzoótica bovina (EBL). A maioria dos animais infectados permanece assintomático, um terço dos animais pode desenvolver linfocitose persistente e 1-5% linfossarcoma, principalmente nos animais com mais de seis anos de idade (Miller *et. al*, 1960; Murtaugh *et. al*, 1991; Burny *et. al*, 1998). O BLV infecta principalmente linfócitos B, mas pode infectar também linfócitos T, monócitos e granulócitos (Camargos *et. al*, 2004). No interior da célula, é capaz de realizar a transcrição reversa e integrar seu DNA proviral no genoma da célula infectada, sendo este local de integração no genoma independente da manifestação clínica (Miyasaka *et. al*, 2014).

A transmissão do BLV pode ocorrer horizontal ou verticalmente, através da transferência de células infectadas. A transmissão do BLV ocorre principalmente através da via iatrogênica, com transferência de sangue de animais infectados, mas em menor proporção pode ocorrer por sêmen, oócitos, saliva, secreção nasal, urina e fezes, nos casos em que há algum processo inflamatório com aumento a população de linfócitos B (Hopkins, 1997). A transmissão vertical pode ser perinatal, pela via transplacentária ou através do canal do parto, ou pós-natal através de colostro e leite (Van Der Maaten *et. al*, 1981a). A transmissão transplacentária ocorre em cerca de 10% dos bezerros nascidos de vacas positivas, independe da ocorrência de infecção durante a gestação, mas é maior em vacas com alta carga viral (Van Der Maaten *et. al*, 1981b; Kono *et. al*, 1983; Thurmond *et. al*, 1983; Ohshima *et. al*, 1984; Agresti *et. al*, 1993; Mekata *et. al*, 2014).

A EBL é considerada uma enfermidade de alta morbidade, por isso os rebanhos infectados normalmente apresentam alta prevalência de animais acometidos (Rajão *et. al*, 2012). A prevalência no país é estimada em 23,7%, ocorrendo maior porcentagem na região Sudeste, com prevalência em torno de 39,48% (Fernandes *et. al*, 2009). Em Minas Gerais, Camargos *et. al* (2002) detectou ocorrência de 38,1% em rebanhos produtores de leite tipo C e 56,8% em tipo A/B, e segundo o autor, essa diferença se deve devido ao maior estresse de manejo a que estes são submetidos. Rajão *et. al* (2012) detectou 79,74% de soropositividade em vacas da raça holandesas e mestiças (holandês x gir) de leite em um rebanho em Minas Gerais.

Os prejuízos diretos da EBL ocorrem devido ao desenvolvimento de linfossarcomas com a morte ou descarte precoce dos animais, condenação de carcaças, queda na produção e custos com os tratamentos de animais doentes (Pelzer, 1997). Não há um consenso na literatura do papel na leucose sobre a produção de leite e parâmetros reprodutivos. Isso se deve à diferença de delineamento dos trabalhos e da presença de outros fatores externos que alteram a produção e a reprodução. Quanto à produção de leite, alguns trabalhos afirmam que há queda (Ott *et. al*, 2003; Rajão *et. al*, 2014), em outros não se detectou essa influência (Tiwari *et. al*, 2005; Kale *et. al*, 2007). Quanto à reprodução, a maioria dos trabalhos não detectou alteração reprodutiva (Huber *et. al*, 1981; D'angelino *et. al*, 1998; Kale *et. al*, 2007), mas outros, no entanto, encontram esta associação (Jacobs *et. al*, 1991; Heald *et. al*, 1992; Pollari *et. al*, 1992; Vanleeuwen *et. al*, 2010).

3.2.4 Vírus da Língua Azul (BTV)

O vírus da língua azul (BTV) é um RNA vírus, pertencente ao gênero *Orbivirus* e família *Reoviridae*. Até o momento já foram identificados 27 sorotipos do vírus, sendo o último identificado no ano de 2014 em caprinos na França (Zientara *et. al*, 2014).

A transmissão do vírus ocorre através de dípteros do gênero *Culicoides*, sendo que em Minas Gerais a espécie *Culicoides insignis* possui grande importância como vetor de BTV (Laender, 2002; Meiswinkel *et. al*, 2008). O díptero adquire o vírus quando realiza o repasto sanguíneo em um animal virêmico e o vetor permanece persistentemente infectado até o final de sua vida (Mellor, 2000). Os bovinos possuem viremia em torno de 100 dias, sendo considerados importantes reservatórios do vírus (Breard *et. al*,

2004). A transmissão também é possível através do sêmen e placenta (Maclachlan *et. al.*, 2000; Saegerman *et. al.*, 2011; Leemans *et. al.*, 2012).

O vírus infecta células endoteliais, causando lesão vascular, e acredita-se que a diferença de apresentação da doença em ovinos e bovinos se deva aos diferentes mediadores inflamatórios e vasoativos produzidos durante a infecção (Demaula *et. al.*, 2002). Em ovinos infectados ocorre febre, descarga nasal serosanguinolenta, edema facial, erosões e úlceras na cavidade oral, dificuldade respiratória devido ao edema pulmonar, laminite com hiperemia da banda coronária e fraqueza devido à necrose muscular, podendo ocorrer também aborto, teratogenicidade e queda na fertilidade (Maclachlan *et. al.*, 2009; Saegerman *et. al.*, 2011). Bovinos infectados eventualmente apresentam doença clínica semelhante aos ovinos, entretanto o mais comum é a ocorrência de abortos, natimortalidade e teratogenicidade em animais infectados (Elbers *et. al.*, 2009; Nusinovici *et. al.*, 2012a; Zanella *et. al.*, 2012; Marceau *et. al.*, 2014). Estas anormalidade reprodutivas foram verificadas com maior intensidade no surto pelo sorotipo 8 na Europa, e acredita-se que se deve ao tropismo deste por células do trofoblasto e sua capacidade de atravessar a barreira placentária, levando às alterações fetais (Dal Pozzo *et. al.*, 2009). O efeito deletério da infecção por BTV nos períodos iniciais da gestação também foi confirmado, levando ao aumento na taxa de retorno ao cio e número de inseminações artificiais por concepção em rebanhos afetados durante o surto na Europa por BTV-8 (Santman-Berends *et. al.*, 2010; Nusinovici *et. al.*, 2012a; Nusinovici *et. al.*, 2012b; Marceau *et. al.*, 2014).

Inquéritos sorológicos em bovinos demonstram que a infecção encontra-se disseminada em vários estados brasileiros, com frequências variando entre 4,82% na Paraíba a até 89,69% no Sergipe (Melo *et. al.*, 1999; Melo *et. al.*, 2000; Lager, 2004). Em Minas Gerais, Konrad *et. al.* (2003) detectou 59,51% (776/1304) amostras positivas, e Castro *et. al.* (1992) detectou ocorrência em 76,3% (313/451).

3.2.5 *Leptospira interrogans*

O gênero *Leptospira* compreende bactérias espiroquetas saprófitas e patogênicas, capazes de infectar humanos e animais domésticos e silvestres. Tradicionalmente, o gênero era dividido em duas espécies, *L. interrogans* (patogênicas) e *L. biflexa* (não patogênicas), e estas divididas em sorogrupos e sorovariedades (Musso *et. al.*, 2013). Em 2007, estabeleceu-se a classificação a partir de estudos moleculares em treze genomoespécies de leptospiros patogênicas (Adler, 2010). Antigenicamente, as espécies são divididas em sorovares de acordo com a expressão de lipopolissacarídeos (LPS) de superfície e são conhecidos 250 sorovares patogênicos agrupados em 26 sorogrupos (Murray *et. al.*, 2013).

A infecção por *Leptospira* encontra-se disseminada mundialmente. No Brasil, Favero (2001) avaliou 31325 soros provenientes de 21 estados brasileiros, e identificou 37,94% de animais positivos a pelo menos uma sorovariedade, e em Minas Gerais, essa detecção foi em 44,3% das amostras e 87,3% das propriedades. Nicolino (2011) detectou 20,7% de animais positivos e 80,7% dos rebanhos positivos na microrregião de Sete Lagoas (MG). A sorovariedade mais prevalente nos estudos é a *hardjo* com até 59,7% dos animais reagentes (Castro *et. al.*, 1992; Favero *et. al.*, 2001; Araújo *et. al.*, 2005).

A transmissão ocorre através da exposição à água ou solo contaminado por urina de animais infectados, com penetração ativa da espiroqueta em pequenos cortes ou abrasões cutâneas, mucosas e pele úmida (Adler, 2010). A transmissão venérea tem sido investigada, com identificação da bactéria no sêmen e muco cervico-vaginal em diversas espécies (Ellis *et. al.*, 1986; Bolin *et. al.*, 1992; Dhaliwal *et. al.*, 1996a; Heinemann *et. al.*, 2000; Lilenbaum *et. al.*, 2008; Hamond *et. al.*, 2014). Quando a espécie animal ou homem entram em contato com a sorovariedade a qual não estão adaptados, pode ocorrer a doença clínica severa e fatal, caracterizada por insuficiência renal e hepática e alterações respiratórias (Levett, 2004).

Algumas espécies de animais são adaptadas a determinadas sorovariedades, atuando como hospedeiros de manutenção, em que permanecem com infecção subclínica e eliminam *Leptospira* na urina intermitentemente no ambiente (Levett, 2004; Lilenbaum *et. al.*, 2014). Os bovinos são hospedeiros de manutenção da sorovariedade *hardjo*, com susceptibilidade elevada à infecção, transmissão endêmica e apresentação da doença na forma crônica com desenvolvimento de problemas reprodutivos (Chiareli *et. al.*, 2012). Os trabalhos associam a infecção por *Leptospira* à repetição de cio, abortos, retenção de placenta, nascimento de bezerras fracas e natimortalidade (Dhaliwal *et. al.*, 1996b; Dhaliwal *et. al.*,

1996c; Guítian *et. al.*, 1999; Langoni *et. al.*, 1999; Smyth *et. al.*, 1999; Konrad, 2003; Atxaerandio *et. al.*, 2005; Escamilla *et. al.*, 2007; Mineiro *et. al.*, 2007).

3.2.6 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa ambiental e comensal do trato gastrointestinal dos mamíferos e que, em algumas situações, é capaz de causar doença em humanos e animais (Bicalho *et. al.*, 2010). Durante o parto, há a dilatação da cérvix para a passagem do feto, e com isso, exposição do útero aos contaminantes bacterianos presentes no ambiente, fezes e pele. (Sheldon, 1999). Sabe-se que a *E.coli* é a primeira bactéria a colonizar o útero na primeira semana pós-parto, com ocorrência entre 24,5% e 44,8% entre o sétimo e décimo dia, com queda progressiva e detecção em até 7,9% ao final da quarta semana pós-parto (Bicalho *et. al.*, 2010; Mcdougall *et. al.*, 2011; Werner, 2012; Prunner *et. al.*, 2014a; Prunner *et. al.*, 2014b). Entretanto, não está bem estabelecido o papel da *E. coli* na infecção uterina puerperal. Alguns trabalhos afirmam que a infecção por *E. coli* por si só não desencadeia endometrite clínica ou subclínica, mas poderia atuar inibindo a ação de polimorfonucleares do útero, o que facilitaria a infecção subsequente por *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum*, estes altamente associados à ocorrência de doença uterina clínica nas primeiras semanas pós-parto (Zerbe, 2001; Baránski *et. al.*, 2012; Bicalho *et. al.*, 2012; Prunner *et. al.*, 2014a; Prunner *et. al.*, 2014b). Outros autores, entretanto, afirmam que certos fatores de virulência presentes na *E. coli* podem aumentar a sua capacidade de aderência e invasão às células endometriais, resultando em endometrite na primeira semana pós parto e redução da chance de concepção em até 9,2 vezes (Bicalho *et. al.*, 2010; Sheldon, 2010; Bicalho *et. al.*, 2012).

Após o período puerperal, a maioria das vacas espontaneamente elimina *E. coli*, no entanto Mcdougall *et. al.* (2011) relata a detecção de 7,9% e 4,6% das vacas com presença do agente no útero após a quarta e sexta semana pós-parto e Baránski *et. al.* (2012) em 25,2% e 18,4% no mesmo período. Murty (1974) relata que a presença de bactérias no útero poderia alterar o microambiente uterino, prejudicando a sobrevivência do espermatozoide. Infecções bacterianas podem influenciar também na função ovariana, com diminuição da foliculogênese e produção de estrógeno, assim como diminuição na produção de progesterona pelo corpo lúteo, esta essencial para a manutenção da gestação em bovinos (Williams *et. al.*, 2005; Williams, 2007). No entanto, outros autores não associam a detecção microbiológica por *E. coli* e ocorrência de infertilidade (Bonnett *et. al.*, 1993; Galindo *et. al.*, 2003; Prunner *et. al.*, 2014b).

3.2.7 *Campylobacter fetus*

O gênero *Campylobacter* abrange patógenos de humanos e animais que afetam principalmente os sistemas gastrointestinal e reprodutivo (Mshelia, 2007). A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma doença reprodutiva infecciosa de transmissão venérea causada pelo *Campylobacter fetus* (*subsp.*) *venerealis*, bactéria microaerófila que permanece nas criptas prepuciais dos touros, principalmente dos mais velhos, devido ao maior tamanho destas (Vargas, 2003; Bondurant, 2005; Iraola, 2012). Os touros não apresentam sintomatologia clínica, mas permanecem como carreadores da bactéria por longos períodos (Hoffer, 1981). A transmissão ocorre durante a monta natural ou através de sêmen contaminado utilizado na inseminação artificial (Jimenez, 2011; Waldner, 2013).

Novilhas e vacas mais velhas são mais susceptíveis, devido ao baixo nível de imunidade local (Hoffer, 1981). Na fêmea, a bactéria possui tropismo pelas células endometriais e sua infecção resulta em infertilidade temporária, com cervicite, endometrite e salpingite, mais pronunciada 8^a a 13^a semana pós-infecção, resultando em queda na taxa de prenhez do rebanho e alta taxa de retorno ao cio (Stoessel, 1982; Stynen, 2003; Waldner, 2013; Truyers, 2014). O aborto também pode ocorrer principalmente do 4^o ao 6^o mês de gestação, porém a ocorrência de aborto é pouco frequente (menos de 10% das fêmeas infectadas) (Garcia, 1993). Entretanto, em um estudo em rebanho de corte na Argentina, Jimenez (2011) detectou que a infecção do touro aumenta em 3,08 vezes o risco de aborto no rebanho. A doença é autolimitante e, após três a cinco meses, há o desenvolvimento de imunidade de mucosas (principalmente IgA), debelando a infecção (Stoessel, 1982). Em uma infecção experimental, constatou-se que após duas semanas, o *C. fetus* foi eliminado do útero, permanecendo apenas na vagina e cérvix (Schurig, 1974).

No Brasil, a primeira identificação do agente foi realizada em 1956, através do isolamento do então chamado *Vibrio fetus* a partir de um feto abortado (D'apice, 1956). Em Minas Gerais, identificou-se 25,5% de fêmeas infectadas em um rebanho com elevada taxa de retorno ao cio e no Pantanal Matogrossense em 52,3% dos touros e 23,8% das fêmeas (Pellegrin, 2001). No Rio Grande do Sul, analisando amostras coletadas entre os anos 1999 e 2010, 6,5% dos lavados prepuciais de touros de centrais de inseminação, 9% dos lavados prepuciais de touros de monta natural, 13,6% dos aspirados cervicais e em 33,4% do conteúdo abomasal de fetos abortados houve identificação do *C. fetus* (Ziech, 2014).

3.2.8 *Tritrichomonas foetus*

Tritrichomonas foetus é um protozoário piriforme caracterizado por possuir três flagelos anteriores livres e um flagelo posterior, e é o agente causador da tricomonose bovina, doença venérea que induz a altos índices de mortalidade embrionária precoce, infertilidade e abortos em rebanhos de leite e corte (Skirrow *et. al.*, 1988; Yule *et. al.*, 1989; Felleisen, 1999; Rae *et. al.*, 2006).

O protozoário habita a superfície epitelial do pênis, prepúcio e uretra e estabelece no touro infecção crônica e assintomática (Cobo *et. al.*, 2004b). Os touros atuam como fonte de infecção, e transmitem o *T. foetus* às fêmeas suscetíveis durante a monta natural (Yule *et. al.*, 1989). Em regiões endêmicas da doença, a transmissão por instrumentos contaminados, sêmen ou exames ginecológicos também pode ocorrer. A maior ocorrência da tricomonose bovina está associada a rebanhos numerosos, presença de touros velhos e baixa proporção touro:vacas (Villarroel *et. al.*, 2004; Rae *et. al.*, 2006). Touros com idade superior a 36 meses têm até 3,45 vezes maior chance de estarem infectados do que touros jovens (Mendoza-Ibarra *et. al.*, 2012). O protozoário não é capaz de interferir na taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário na fertilização *in vitro* (FIV), devido à pequena capacidade de sobrevivência deste nos meios utilizados na FIV (Bielanski *et. al.*, 2004).

Nas fêmeas, a infecção pode se apresentar desde assintomática a até severa, com vaginite, cervicite, endometrite, salpingite e piometra, que pode resultar em infertilidade temporária e raramente abortos (Parsonson *et. al.*, 1976). Em rebanhos infectados pode ocorrer uma taxa de natalidade inferior à esperada, redução de 20 a 40% na taxa de prenhez e presença de lotes de bezerras com falhas em determinadas faixas etárias (Pellegrin, 2003). A infecção por *T. foetus* aumenta a chance de repetição de cio em até 5,2 vezes (Mendoza-Ibarra *et. al.*, 2012). A patogênese da infecção na fêmea ainda não está bem estabelecida (Cobo *et. al.*, 2004a), mas sabe-se que há a formação de agregados de células mononucleares na submucosa da vagina e útero, fibrose periglandular e necrose *in vitro* em células das tubas uterinas (Cobo *et. al.*, 2004a; Agnew *et. al.*, 2008; Midlej *et. al.*, 2009). O aborto pode ocorrer comumente até os cinco meses de gestação e resulta da hipotrofia placentária e invasão fetal, a qual induz no feto lesões gastrointestinais com identificação do parasita no conteúdo abomasal (Skirrow *et. al.*, 1988; Rhyann *et. al.*, 1995; Felleisen, 1999; Guven *et. al.*, 2013). A doença é normalmente autolimitante, sendo eliminada do trato genital da fêmea após alguns meses, com a produção de IgA e IgG1 nas mucosas, mas cerca de 5% das fêmeas podem atuar como carreadoras, mantendo a infecção por período superior a 9 semanas (Felleisen, 1999; Pellegrin, 2003).

A primeira identificação do *T. foetus* no Brasil foi realizada em 1948 em uma amostra de sêmen de um touro doador de central no Rio Grande do Sul (Roehle *et. al.*, 1948) citado por (Gomes *et. al.*, 1991). Em outros trabalhos publicados detectou-se o protozoário em touros e fetos abortados (Mello *et. al.*, 1954; Leite *et. al.*, 1995) citados por (Pellegrin, 2003). Entretanto, trabalhos recentes não isolaram o parasita em touros e vacas com ou sem problemas reprodutivos no Distrito Federal, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Nascimento *et. al.*, 2005; Rocha *et. al.*, 2009; Leal *et. al.*, 2012).

3.2.9 *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário da família *Sarcocystidae*, semelhante estruturalmente ao *Toxoplasma gondii*. O ciclo de vida possui os cães e coiotes como os hospedeiros definitivos e como hospedeiros intermediários principalmente os bovinos, mas outros mamíferos podem ser acometidos, como equinos, ovinos e caprinos (McCallister *et. al.*, 1998; Gondim *et. al.*, 2004; Dubey *et. al.*, 2011). O

parasita possui três estágios infecciosos: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos. Os taquizoítos são encontrados em diversas células do hospedeiro intermediário, incluindo células neuronais, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, esqueléticas, células tubulares renais. Na infecção latente, formam-se cistos contendo bradizoítos, que permanecem normalmente no sistema nervoso central e musculatura (Dubey *et. al.*, 1996; Dubey *et. al.*, 2007).

Os cães eliminam nas fezes oocistos não esporulados que sofrem esporulação em 24 horas no ambiente (Lindsay *et. al.*, 1999). Os hospedeiros intermediários adquirem o parasito pela ingestão dos oocistos ou via transplacentária (Davison *et. al.*, 1999). No hospedeiro intermediário, o parasita permanece na forma de cistos na musculatura, e os cães se infectam através da ingestão de qualquer tecido bovino contendo cistos, como fetos abortados ou placenta, mas também pode ocorrer transmissão transplacentária no cão (Dijkstra *et. al.*, 2001; Gondim *et. al.*, 2002; Dubey *et. al.*, 2011). Os cães normalmente são assintomáticos, mas podem apresentar distúrbios neuromusculares (Dubey *et. al.*, 2011).

Em bovinos, a transmissão transplacentária é considerada a mais importante, podendo ocorrer a transmissão placentária exógena, pela ingestão dos oocistos esporulados durante a gestação, ou endógena, através da recrudescência dos cistos presentes na musculatura durante a gestação (Williams *et. al.*, 2009; Regidor-Cerrillo *et. al.*, 2014). Orozco *et. al.* (2013) descreve a presença de oocistos no miométrio de vacas não gestantes, e sugere que *N. caninum* permanece na forma de cistos no útero e durante a prenhez e com a imunossupressão advinda da gestação, encontra condições apropriadas para sair da latência e causar infecção fetal.

Experimentalmente, a infecção no primeiro trimestre de gestação resulta normalmente em morte fetal e aborto, e a infecção a partir do segundo semestre, no nascimento de bezerros persistentemente infectados (Gibney *et. al.*, 2008; Almería *et. al.*, 2010). O parasita é considerado por alguns trabalhos como o mais importante agente causador de aborto em bovinos (López-Gatius *et. al.*, 2005; Waldner, 2005; González-Warleta *et. al.*, 2008; Santolaria *et. al.*, 2009; Bruhn *et. al.*, 2013). Os estudos atuais não estabeleceram influência da infecção na fertilidade das vacas acometidas (López-Gatius *et. al.*, 2004b; López-Gatius *et. al.*, 2005; Santolaria *et. al.*, 2009; Santos *et. al.*, 2009).

A neosporose bovina no Brasil encontra-se amplamente disseminada em todas as regiões brasileiras acometendo rebanhos de leite e de corte (Gennari, 2004). Em um estudo a partir de um banco de 2336 soros provenientes de fêmeas de leite e de corte de seis estados brasileiros, Ragozo *et. al.* (2003) detectou ocorrências de: 28,2% (MS), 29% (MG), 22,22 (PR), 14,7% (RJ), 20% (RS) e 23,6% (SP). Estudos recentes identificaram prevalência de 50,54% no Maranhão e ocorrência de 12,5% no estado do Tocantins (Teixeira *et. al.*, 2009; Martins *et. al.*, 2011). Em Minas Gerais, Santos *et. al.* (2009) detectou ocorrência em 46,25% em bezerras e novilhas na microrregião de Lavras. A soroprevalência foi de 21,6% na Mesorregião dos Campos das Vertentes e 21,9% na Microrregião de Sete Lagoas (Nicolino, 2011; Bruhn *et. al.*, 2013). Melo *et. al.* (2004) detectou 12,61% de animais positivos provenientes de rebanhos leiteiros do estado de Minas Gerais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e animais

Utilizou-se no experimento 46 vacas leiteiras provenientes de três propriedades identificadas neste trabalho como propriedade A (n=12), propriedade B (n=10) e propriedade C (n=24), sendo as duas primeiras localizadas na região Central e a última na Zona da Mata do estado de Minas Gerais.

As propriedades A e B possuíam vacas mestiças holandês x gir e holandês x guzerá, mantidas em regime extensivo e com a utilização de touros para reprodução. A propriedade C era composta por um rebanho fechado da raça holandesa em regime de *free-stall* e animais mestiços (1/2 holandês x gir) em regime extensivo, com a utilização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Todos os animais do estudo eram negativos para *Brucella abortus* pelo teste do Antígeno Acidificado Tamponado segundo o

Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (MAPA, 2006). Os animais não eram vacinados para BoHV-1, BVDV e *Leptospira*.

Foram utilizadas vacas em várias idades e raças, e todas eram obrigatoriamente não gestantes, pluríparas, apresentavam boa condição clínica, ausência de patologias uterinas e ciclicidade ovariana normal avaliada por palpação retal e ultrassonografia transretal. Estabeleceu-se que as vacas somente seriam utilizadas a partir dos 45 dias pós-parto, para que tenha ocorrido a completa involução uterina, que em vacas holandesas com ou sem retenção de placenta ocorre após $33,5 \pm 11,1$ dias (Martins, 2010) e em mestiças holandês x zebu uma média de 25,19 dias. (Carvalho, 2009).

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil (Protocolo n° 68/2014), no anexo 1 deste trabalho.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o histórico de problema reprodutivo. O grupo 1 (n=23) era composto de animais com histórico de aborto, natimortos, absorção embrionária e número de serviços por concepção igual ou superior a 5. O grupo 2 (n=23) era composto de animais sem histórico de problema reprodutivo. Em cada propriedade utilizou-se o mesmo número de animais no grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2). A tabela 1 descreve a identificação dos animais de cada grupo, de acordo com a propriedade e o problema reprodutivo.

Tabela 1. Descrição dos animais de acordo com o grupo experimental, propriedade e problema reprodutivo.

Grupos experimentais			
	Grupo 1		Grupo 2
	Identificação do animal	Problema reprodutivo	Identificação do animal
Propriedade A	4	Natimorto	1
	5	5 serviços/concepção	2
	6	7 serviços/concepção	3
	7	5 serviços/concepção	9
	8	6 serviços/concepção	10
Propriedade B	17	Aborto	11
	12	Natimorto	14
	13	Natimorto	15
	19	Aborto	16
	21	Natimorto	18
Propriedade C	22	Natimorto	20
	23	Absorção embrionária	25
	26	7 serviços/concepção	28
	27	12 serviços/concepção	33
	29	5 serviços/concepção	36
	30	Natimorto	37
	31	5 serviços/concepção	39
	32	Aborto	40
	34	5 serviços/concepção	41
	35	5 serviços/concepção	43
38	Aborto	44	
42	5 serviços/concepção	45	
48	7 serviços/concepção	46	

Grupo 1: Animais com histórico de problema reprodutivo Grupo 2: Animais sem problema reprodutivo

4.3 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas da veia coccígea através de sistema de coleta a vácuo em tubos siliconizados sem anticoagulante, que foram centrifugados por 10 minutos a 2139g (JOUAN CR422) para a obtenção do soro.

4.4 Testes sorológicos

4.4.1 Soroneutralização para diagnóstico de BoHV-1 e BVDV

O teste de soroneutralização em microplacas foi realizado a partir de adaptação da metodologia proposta pelo *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal* (OIE, 2010). Utilizou-se as amostras virais de referência BoHV-1 (ATCC VR-188) e BVDV tipo 1 (ATCC VR-1422) e linhagem celular MDBK cedida pelo Prof. Amauri Alfieri da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Alíquotas de soro (50µl) inativadas a 56° por 30 minutos foram diluídas em meio essencial mínimo (MEM) seriadamente na razão de dois, em microplaca de poliestireno com 96 cavidades, da diluição 1:2 até a diluição 1:256. Adicionou-se então 50µL da diluição (100 – 200 TCID₅₀) dos vírus testes com incubação da placa por 1 hora em estufa 37° C e 5% CO₂. Após esse tempo, adicionou-se 3 x 10⁴ células MDBK por cavidade. As placas foram incubadas nas mesmas condições anteriores por 72 horas. A leitura foi realizada em microscópio invertido, sendo o título expresso como o inverso da maior diluição em que não foi visualizado efeito citopático, considerado positivo título superior a 2.

4.4.2 Imunodifusão em gel de Ágar para diagnóstico de BLV e BTV

O teste de Imunodifusão em gel de Ágar (IDGA) para o diagnóstico de BLV foi realizado através da metodologia padronizada por Miller (1976), utilizando o antígeno comercial (Tecpar®), de acordo com as recomendações do fabricante. Utiliza-se gel de Ágar noble 1% em tampão fosfato (pH 7,3), depositando 5ml de gel por lâmina de microscopia. A perfuração dos poços no ágar foi feita com cortador padrão com sete furadores de 4 mm de diâmetro, distanciado no máximo 3mm entre si. Adicionou-se soros testes e soro padrão positivo comercial, em poços alternados ao redor do poço central que foi preenchido pelo antígeno comercial. Todos foram adicionados em um volume de 25µL. A leitura foi realizada após 24 e 72h em foco de luz, e o animal foi considerado positivo quando houve a formação da linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste com presença da linha identidade entre o antígeno e soro controle positivo.

O diagnóstico de BTV utiliza metodologia semelhante à descrita para BLV, diferenciando o tampão para confecção do gel e o antígeno. Utilizou-se o antígeno VLA-4, produzido pelo Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (EV/UFGM). O VLA-4 é feito a partir da suspensão viral do BTV sorotipo 4 cultivado em monocamadas de células de rim de macaco verde (VERO-ATCC/CL-81) segundo metodologia descrita por Costa (2000). Utiliza-se gel de agarose 1% em tampão salina (NaCl 0.9%). Como soro controle positivo, utilizou-se soro de animal sabidamente positivo para BTV através de testes moleculares.

4.4.3 Aglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose

O teste de microaglutinação microscópica foi realizado conforme o *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal* (OIE, 2010) Os sorovares e as respectivas amostras de referência estão citados na tabela 2. Utilizou-se 30µL dos soros testes (a uma diluição 1:50) e 30µL dos antígenos (a uma diluição 1:2) em placa de poliestireno de 96 poços. A placa foi incubada ao abrigo da luz durante 2 horas à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em microscópio ótico de campo escuro, e foi considerado positivo para determinada sorovariedade, o soro que apresentar no mínimo 50% de aglutinação com título igual ou superior a 1:100.

Tabela 2. Sorogrupo, sorovares e amostras de referências utilizadas para diagnóstico sorológico de *Leptospira interrogans*.

Sorogrupo	Sorovar	Amostra de Referência
Australis	Bratislava	Jez-bratislava
Serjroe	Hardjo	Hardjoprajitno (HardjoOMS)
Serjoe	Hardjo	Hardjobovis
Serjoe	Hardjo	Genótipo Hardjoprajitno (CTG) ^a
Serjoe	Holffi	3705
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA
Bolivia	Hardjo	Genótipo Hardjoprajitno ^b
Pomona	Pomona	Pomona

^a Amostra isolada por Morais (1994)^b Amostra isolada por Chiareli *et. al* (2012)

4.4.4 Imunofluorescência indireta para diagnóstico de Neosporose

As amostras de soros foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade de São Paulo – USP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna e Prof^a. Dra. Solange Maria Gennari. Foi considerada positiva a amostra que apresentou fluorescência na superfície dos taquizoítos de *N. caninum* na diluição igual ou menor que 1:100.

4.5 Exame ginecológico e biópsia uterina

Anterior ao procedimento de biópsia, realizou-se o exame ginecológico por palpação retal e ultrassonografia transretal segundo Ferreira (2010) utilizando ultrassom (Chison®), com o objetivo de descartar possibilidade de gestação recente e avaliar a presença de corpo lúteo e/ou folículos ovarianos.

Realizou-se anestesia epidural utilizando 3 a 5ml de cloridrato de lidocaína a 2% (Dorfin®) no espaço intervertebral entre a primeira e segunda vértebras coccígeas. A pinça utilizada era uma réplica da pinça de biópsia equina Hauptner®, que era protegida por camisa sanitária descartável. O procedimento foi realizado conforme descrito por Chapwanya *et. al* (2010) e previamente era realizada limpeza da região vulvar com água e secagem com papel toalha. A pinça era introduzida através da vagina e cérvix, guiada através de manipulação retal. Antes de atingir o lume uterino, rompia-se a camisa sanitária e então aplicava-se uma leve pressão digital via transretal sobre o tecido uterino de interesse, guiando-o em encontro à extremidade da pinça aberta, que ao ser fechada e tracionada, extraía um fragmento de aproximadamente 80 mm². As biópsias foram realizadas no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo ovariano, com o objetivo de simular o ambiente uterino a que o embrião estaria exposto, caso a oócito fosse fecundado. Caso o corpo lúteo ovariano estivesse ausente, a biópsia era realizada no corno esquerdo, pois se sabe que a maior parte das mortalidades embrionárias ocorre no corno uterino esquerdo devido ao menor fluxo sanguíneo ovariano causado pela compressão exercida pelo rúmen (Roy *et al.*, 1983) citado por (Ferreira *et. al*, 1988). Todos os procedimentos de biópsia uterina foram realizadas pelo mesmo operador.

O fragmento foi acondicionado em criotubo livre de RNases e DNases (Sarsdedt) e mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) na fazenda. Na Escola de Veterinária foram armazenados a -80°C.

4.6 Histologia da biópsia uterina

Com o objetivo de caracterizar as camadas de tecido uterino que eram coletadas, realizou-se histologia de um fragmento de biópsia. O processamento foi realizado no Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob auxílio do Prof. Anilton Cesar Vasconcelos. A coloração utilizada foi hematoxilina-eosina.

4.7 Extração do material genético

No fluxo laminar, os fragmentos de tecido uterino foram manipulados em placa de petri estéril e descartável e seccionados pela metade com auxílio de lâmina de bisturi (n.22) também estéril e descartável. Cada porção de tecido foi submetida à extração de DNA ou RNA, utilizando

respectivamente, *QIAmp DNA Mini Kit* (QIAGEN) e *SV Total RNA Isolation System* (Promega) seguindo as recomendações dos fabricantes. Para otimizar os procedimentos, os tecidos foram macerados nos respectivos tampões de lise utilizando pistilos estéreis para microtubo tipo Eppendorf 0,6ml.

A quantificação de DNA e RNA foi realizada por espectrofotometria utilizando NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE HEALTHCARE).

4.8 PCR para avaliação da eficiência da extração de DNA

Para avaliar a eficiência das extrações de DNA, realizou-se PCR convencional para o gene GAPDH conforme descrito por Oliveira (2012) e PCR em tempo real para o gene beta-actina segundo Bielanski *et. al* (2009). Os reagentes da PCR convencional e tempo real utilizados foram Go taq Flexi® DNA Polymerase (Promega) e Precision 2X qPCR Mastermix (Primer design), respectivamente. As técnicas utilizadas estão descritas na tabela 3. Os iniciadores utilizados estão descritos detalhadamente no anexo 2 deste trabalho.

Tabela 3. Descrição das técnicas de PCR utilizadas como controle da extração de DNA.

Gene normalizador	PCR	Tamanho do produto	Referência
GAPDH	Convencional	709pb	(Oliveira, 2012)
Beta-actina	Tempo real	58pb	(Bielanski <i>et al.</i> , 2009)

4.9 PCR para detecção dos agentes em tecido uterino

4.9.1 PCR tempo real para BoHV-1, *Tritrichomonas foetus* e *Leptospira interrogans*.

A detecção de BoHV-1, *Tritrichomonas foetus* e *Leptospira interrogans* em tecido uterino foi feita através de PCR em tempo real utilizando sondas de hidrólise tipo *Taqman*, padronizadas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG). Utilizou-se o Precision 2X qPCR Mastermix (Primer design) em equipamento LightCycler® 480 (Roche). As condições das reações estão descritas na tabela 4 e as informações sobre os iniciadores utilizados estão descritas detalhadamente no anexo 2 deste trabalho.

Como controle positivo das reações, utilizou-se amostra de BoHV-1 cedido pelo Laboratório de Diagnóstico de doenças virais do LANAGRO (MG) e plasmídeo contendo fragmento de *Tritrichomonas foetus*. Como controle positivo de *Leptospira interrogans*, utilizou-se plasmídeo contendo fragmento de *Leptospira interrogans* e DNA proveniente de tecido uterino contaminado com cultura bacteriana.

Tabela 4. Condições das reações de PCR para detecção do DNA de *BoHV-1*, *Tritrichomonas foetus* e *Leptospira interrogans* em amostras de tecido uterino.

Agente	Reação					Ciclo
	MP	IFR	SH	DNA	H ₂ O	
BoHV-1	μl	pmol/μL	pmol/μL	μL	H ₂ O	1. 50° 2'
	12,5	0,4	0,2	3	DEPEC estéril q.s.p. 25μL	2. 95° 10' 3. 45x (95° 15'' e 60° 1')
<i>Tritrichomonas foetus</i>	12,5	0,4	0,2	3	q.s.p. 25μL	1. 50° 2'
						2. 95° 10' 3. 45x (95° 15'' e 60° 1')
<i>Leptospira interrogans</i>	12,5	0,88	0,2	3	q.s.p. 25μL	1. 50° 2'
						2. 95° 10' 3. 45x (95° 15'' e 60° 1')

MP: Precision 2X qPCR Mastermix(Primer design) IFR: Iniciadores *forward* e *reverse* na reação SH: Sonda de hidrólise

4.9.2 PCR tempo real para *Campylobacter fetus*

A detecção de *Campylobacter fetus* em tecido uterino foi feita através de PCR em tempo real com detecção por agente intercalante de DNA (Syber Green), padronizada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG). Utilizou-se o kit NEOTAQMaster Mix Kit (Ampliqon), em equipamento LightCycler® 480 (Roche). As condições da reação estão descritas na tabela 5 e os iniciadores utilizados estão descritos detalhadamente no anexo 2. Como controle positivo, utilizou-se plasmídeo contendo fragmento de *Campylobacter fetus*.

Tabela 5. Condições da reação de PCR para detecção do DNA de *Campylobacter fetus* em amostras de tecido uterino.

Agente	Reação				Ciclo	
	MN μl	IFR pmol/μL	DMSO μL	DNA μL	H ₂ O DEPEC estéril q.s.p 25μL	1. 95° 5' 2. 45x (95° 10'' e 60° 1') 3. Tm (99°5'' e 60° 1')
<i>Campylobacter fetus</i>	4	0,5	2	2		

MN: Mix NEOTAQMaster Mix Kit (Ampliqon) IFR: Iniciadores *forward* e *reverse* na reação DMSO: dimetilsulfóxido Tm: temperatura de *melting*

4.9.3 Nested PCR para detecção do BLV e PCR convencional para *Escherichia coli*

Para detecção do DNA proviral de BLV, realizou-se *nested*PCR conforme descrito por OIE Terrestrial Manual (OIE, 2010). Os reagentes utilizados eram do kit comercial Go taq Flexi® DNA Polymerase (Promega). As reações foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Como controle positivo utilizou-se DNA extraído a partir da linhagem celular FLK (*fetal lamb kidney*), persistentemente infectada por BLV. A PCR utilizada está descrita na tabela 6 e os iniciadores utilizados estão descritos detalhadamente no anexo 2.

Tabela 6. Reação de PCR utilizada para detecção do DNA proviral de BLV em amostras de tecido uterino.

Agente	PCR	Tamanho do produto	Referência
BLV	Externa	440pb	OIE, 2010
	Interna	341pb	

A PCR convencional para detecção de DNA de *E. coli* foi desenvolvida utilizando iniciadores descritos por Malinen (2003). Utilizou-se kit comercial Go taq Flexi® DNA Polymerase (Promega) e as reações foram feitas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied). As condições da reação estão descritas na tabela 7 e os iniciadores utilizados estão descritos no anexo 2.

A visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5mg/mL). Utilizou-se 10μL do amplificado, e os produtos esperados foram identificados a partir da comparação com o padrão de peso molecular de 100 pares de bases.

Tabela 7. Condições da reação de PCR para detecção do DNA de *Escherichia coli* em amostras de tecido uterino.

Agente	Reação							Ciclo
<i>E. coli</i>	TG μL	MgC ₂ mM	dNTP mM	TP U/μL	IFR pmol/μL	DNA μL	H ₂ O DEPEC estéril	1. 95° 5' 2. 35x (95° 15''; 60° 20''; 70° 30'') 3. 72° 7'
	4	3	1,2	0,04	0,4	3	q.s.p. 25μL	

TG: GoTaq® Flexi Buffer (Promega) TP: GoTaq® DNA Polymerase (Promega). IFR: Iniciadores *forward* e *reverse* na reação.

4.9.4 PCR tempo real para detecção de *Neospora caninum*

A detecção de *Neospora caninum* em tecido uterino foi feita através de PCR em tempo real utilizando sondas de hidrólise, de acordo com o descrito por Ghalmi (2008). Os reagentes utilizados pertenciam ao kit comercial TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e a reação foi realizada em equipamento LightCycler® 480 (Roche). A técnica utilizada está descrita na tabela 8, e os iniciadores utilizados estão descritos detalhadamente no anexo 2.

Tabela 8. Reação de PCR utilizada para detecção do DNA de *Neospora caninum* em amostras de tecido uterino.

Agente	PCR	Tamanho do produto	Referência
<i>Neospora caninum</i>	qPCR	142pb	Ghalmi, 2008

Como controles positivos, utilizou-se DNA extraído de amostras de cultivo de taquizoítos de *Neospora caninum* gentilmente cedidos pelo Prof. Rinaldo Aparecido Mota (UFRPE) e Profa. Solange Maria Gennari (USP).

4.9.5 RT-qPCR para detecção de BTV e BVDV

A detecção de RNA dos vírus BTV e BVDV em tecido uterino foi realizada por RT-qPCR descritas por Shawa (2007) e Baxi (2006) respectivamente. A produção do DNA complementar a partir do RNA foi realizada concomitantemente à reação de PCR, utilizando QuantiFast Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) para detecção de BVDV e TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied biosystems) para detecção de BTV. Como controle positivo utilizou-se amostras cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico de doenças virais do LANAGRO (MG). Todas as reações foram feitas em equipamento LightCycler® 480 (Roche). As reações de PCR utilizadas estão descritas na tabela 9 e os iniciadores utilizados estão descritos detalhadamente no anexo 2.

Tabela 9. Reações de PCR utilizadas para detecção dos RNA virais de BTV e BVDV em amostras de tecido uterino.

Agente	PCR	Tamanho do produto	Referência
BTV	RT-qPCR	97pb	Shawa, 2007
BVDV	RT-qPCR	ND	Baxi, 2006

ND: Não descrito na fonte consultada

4.10 Clonagem e sequenciamento

As amostras que foram consideradas positivas na PCR, excisou-se a banda no gel e realizou-se extração de DNA utilizando o kit Axygen™ Axyprep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen). O produto proveniente

de PCR em tempo real foi clonado utilizando pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector Systems e a extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System, ambos da Promega.

O sequenciamento das amostras foi realizado pelo Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Aquacen) da Escola de Veterinária da UFMG utilizando método de Sanger em equipamento 3500Genetic Analyzers (Applied Biosystems). As sequências foram agrupadas utilizando o programa DNA Baser® e comparou-se a similaridade ao banco de sequencias do NCBI (BLAST®).

4.11 Análise estatísticas

Utilizou-se o Teste Exato de Fisher com $p < 0,05$ através do programa STATA Versão 12.1 (StataCorp) para avaliar: se as propriedades apresentaram diferenças quanto à frequência dos agentes nos rebanhos, influência da sorologia ou agente no útero sobre a presença de problema reprodutivo e se a detecção de determinado agente no útero é influenciada pela presença de corpo lúteo ovariano.

5. RESULTADOS

5.1 Histologia da biópsia uterina

A histologia da amostra de tecido uterino coletado através do procedimento de biópsia está representada na Figura 1. Neste fragmento, identifica-se o endométrio, constituído de tecido conjuntivo frouxo contendo algumas glândulas endometriais; miométrio, composto células musculares lisas, e o perimétrio contendo e tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos.



Figura 1. Histologia de amostra de biópsia uterina. a: Endométrio uterino, apresentando tecido conjuntivo frouxo e algumas glândulas endometriais b: Miométrio com células musculares lisas c: Perimétrio composto por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos abundantes (Coloração Hematoxilina- Eosina – 100X).

5.2 Eficiência da extração de DNA

Todas as amostras de DNA utilizadas foram detectadas através dos genes normalizadores beta-actina (Figura 2) e GAPDH (Figura 3).

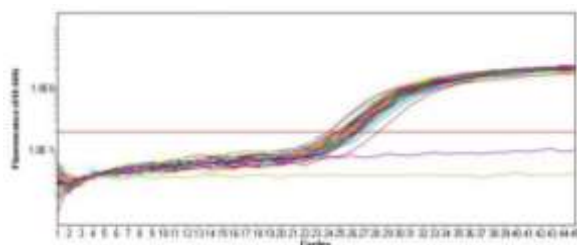


Figura 2. Curvas de amplificação de DNA para o gene beta-actina. As linhas sem amplificação são os controles negativos da reação.

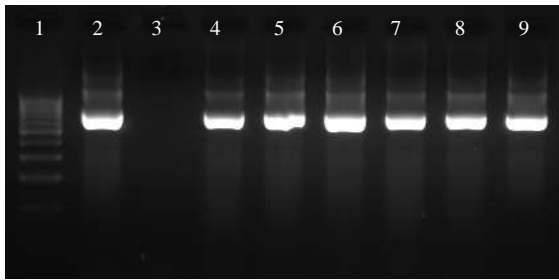


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene normalizador GAPDH em amostras de biópsia uterina. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: Controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaleta 4-9: amostras de DNA uterino.

5.3 Frequência de animais sorologicamente positivos entre as propriedades

A ocorrência de anticorpos contra BoHV-1, BVDV, BLV, BTV e *Neospora caninum* está demonstrada na tabela 10 e contra os diferentes sorovares de *Leptospira interrogans* nas tabelas 11 e 12.

Tabela 10. Ocorrência de animais sorologicamente positivos para BoHV-1, BVDV, BLV, BTV e *Neospora caninum* por propriedade.

Propriedade	BoHV-1	BVDV	BLV	BTV	<i>Neospora caninum</i>
A (n=12)	91,6% ^a (11/12)	25% ^a (3/12)	91,6% ^a (11/12)	91,6% ^a (11/12)	50% ^a (6/12)
B (n=10)	60% ^a (6/10)	30% ^a (3/10)	90% ^a (9/10)	80% ^a (8/10)	0% ^b (0/10)
C (n=24)	4,1% ^b (1/24)	0% ^b (0/24)	100% ^a (24/24)	91,6% ^a (22/24)	16,6% ^b (4/24)
TOTAL (n=46)	39,1% (18/46)	13% (6/46)	95,6% (44/46)	89,1% (41/46)	21,7% (10/46)

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Tabela 11. Ocorrência de animais sorologicamente positivos para a sorovariabilidade *hardjo* de *Leptospira interrogans* por propriedade.

Propriedade	Sorovar <i>hardjo</i>			
	<i>Hardjo Bovis</i>	<i>Hardjo CTG</i>	<i>Hardjo OMS</i>	<i>Bolivia</i>
A (n=12)	83,3% ^a (10/12)	8,3% ^{a,b} (1/12)	66,6% ^a (8/12)	75% ^a (9/12)
B (n=10)	60% ^a (6/10)	40% ^a (4/10)	50% ^a (5/10)	50% ^{a,b} (5/10)
C (n=24)	41,6% ^a (10/24)	4,1% ^b (1/24)	29,1% ^a (7/24)	20,8% ^b (5/24)
TOTAL (n=46)	56,5% (26/46)	13% (6/46)	43,5% (20/46)	41,3% (19/46)

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Tabela 12. Ocorrência de animais sorologicamente positivos para as sorovarietades *bratislava*, *wolffi*, *hebdomadis*, *pomona* e *icterohaemorrhagiae* por propriedade.

	bratislava	wolffi	hebdomadis	icterohaemorrhagiae	Pomona
A (n=12)	8,3% ^a (1/12)	0% ^{a,b} (0/12)	0% ^a (0/12)	0% ^a (0/12)	0% ^a (0/12)
B (n=10)	30% ^a (3/10)	30% ^b (3/10)	10% ^a (1/10)	0% ^a (0/10)	0% ^a (0/10)
C (n=24)	41,6% ^a (10/24)	0% ^a (0/24)	0% ^a (0/24)	0% ^a (0/24)	0% ^a (0/24)
TOTAL (n=46)	30,4% (14/46)	6,5% (3/46)	2,1% (1/46)	0% (0/46)	0% (0/46)

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

5.4 Associação entre sorologia e ocorrência de problema reprodutivo

A distribuição de animais sorologicamente positivos para BoHV-1, BVDV, BLV, BTV e *Neospora caninum* entre o grupo 1 (animais com problema reprodutivo) e grupo 2 (animais sem problema reprodutivo) está demonstrada na tabela 13. A presença de animais sorologicamente positivos contra os diferentes sorovares de *Leptospira interrogans* de acordo com o grupo experimental está descrita na tabela 14.

Tabela 13. Distribuição de resultados positivos nas sorologias para BoHV-1, BVDV, BTV e *Neospora caninum* por grupo experimental.

	BoHV-1	BVDV	BLV	BTV	<i>Neospora caninum</i>
Grupo 1 (n=23)	43,5% ^a (10/23)	8,7% ^a (2/23)	95,6% ^a (22/23)	87% ^a (20/23)	26% ^a (6/23)
Grupo 2 (n=23)	34,8% ^a (8/23)	17,4% ^a (4/23)	95,6% ^a (22/23)	91,3% ^a (21/23)	17,4% ^a (4/23)
TOTAL (n=46)	39,1% (18/46)	13% (6/46)	95,6% (44/46)	89,1% (41/46)	21,7% (10/46)

Grupo 1: Animais com problema reprodutivo Grupo 2: Animais sem problema reprodutivo.

Letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste exato de Fisher ($p > 0,05$).

Tabela 14. Distribuição de resultados positivos nas sorologias para as sorovarietades de *Leptospira interrogans* por grupo experimental.

Grupo	Sorovar								
	<i>Hardjo</i>				<i>bl</i>	<i>wl</i>	<i>hb</i>	<i>ic</i>	<i>Po</i>
	<i>HB</i>	<i>HC</i>	<i>HO</i>	<i>BO</i>					
Grupo 1 (n=23)	47,8% ^a (11/23)	8,7% ^a (2/23)	34,8% ^a (8/23)	39,1% ^a (9/23)	30,4% ^a (7/23)	4,3% ^a (1/23)	0% ^a (0/23)	0% ^a (0/23)	0% ^a (0/23)
Grupo 2 (n=23)	65,2% ^a (15/23)	17,4% ^a (4/23)	52,2% ^a (12/23)	43,5% ^a (10/23)	30,4% ^a (7/23)	8,7% ^a (2/23)	4,3% ^a (1/23)	0% ^a (0/23)	0% ^a (0/23)
Total (n=46)	56,5% (26/46)	13% (6/46)	43,5% (20/46)	41,3% (19/46)	30,4% (14/46)	6,5% (3/46)	4,3% (2/46)	0% (0/46)	0% (0/46)

Grupo 1: Animais com problema reprodutivo Grupo 2: Animais sem problema reprodutivo. Sorovares: *bl*: bratislava; *wl*: wolffi; *hb*: hebdomadis; *ic*: icterohaemorrhagiae e *po*: pomona. Amostras de referência: *HB*: Hardjobovis; *HO*: Hardjo OMS; *HC*: Hardjo CTG; *BO*: Bolívia. Letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste exato de Fisher ($p > 0,05$).

5.5 Associação entre os agentes infecciosos no tecido uterino e a ocorrência de problema reprodutivo

Nas amostras analisadas, detectou-se através das técnicas moleculares o material genético de BLV, *T. foetus* e *E. coli*, que serão detalhados posteriormente. Não houve detecção em nenhuma amostra BoHV-1, BVDV, BTV, *Neospora caninum*, *Leptospira interrogans*, e *Campylobacter fetus*, cujas curvas de amplificação estão demonstradas na figura 4.

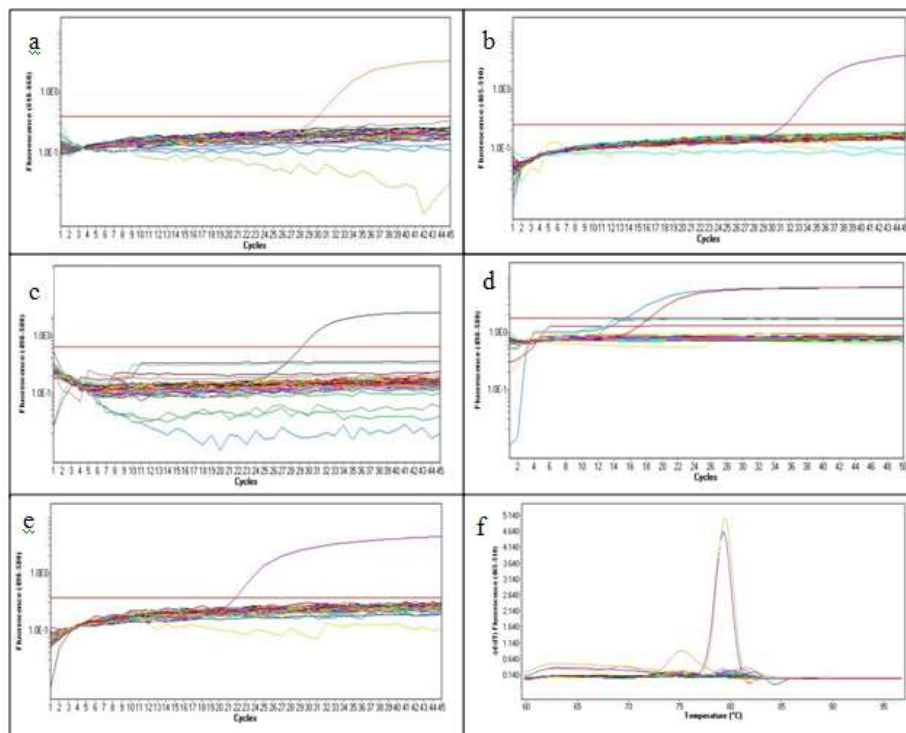


Figura 4. Curvas de amplificação de BoHV-1 (a); BVDV (b); BTV (c); *Neospora caninum* (d); *Leptospira interrogans* (e). Curva de *melting* de *C. fetus* (e). As curvas demonstradas nos gráficos são os controles positivos utilizados nas reações.

A *nestedPCR* para BLV detectou no tecido uterino DNA proviral do vírus (Figura 5) em 52,2% (24/46) dos animais do estudo. O sequenciamento dos produtos de PCR demonstrou similaridade de 94-100% com seqüências da região env de isolados de BLV (GenBank: FJ808579.1; DQ059421.1; JN254639.; JN254638.1). A identificação de BLV no útero foi independente da presença de problema reprodutivo (Tab. 15). A *nestedPCR* da biópsia uterina apresentou baixa sensibilidade (54,5%) e elevada especificidade (100%) em relação ao IDGA (Tab. 16).

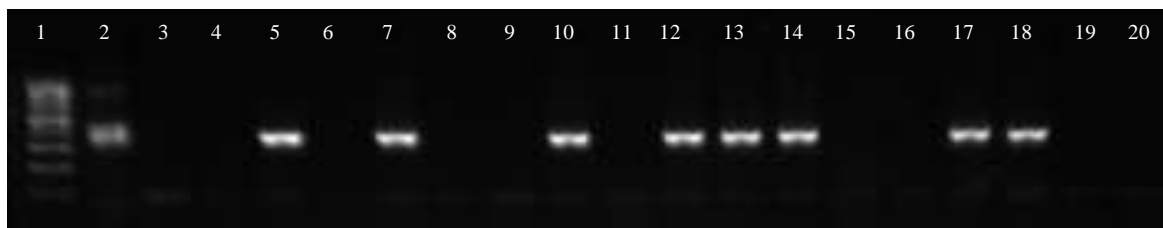


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do DNA proviral de BLV em amostras de biópsia uterina. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: Controle positivo, canaleta 3: controle negativo, canaleta 4-20: amostras de DNA uterino.

Tabela 15. Ocorrência do material genético de BLV, *T. foetus* e *E. coli* no tecido uterino por grupo experimental.

	BLV	<i>Tritrichomonas foetus</i>	<i>E. coli</i>
Grupo 1 (n=23)	47,8% ^a (11/23)	91,3% ^a (21/23)	30,4% ^a (7/23)
Grupo 2 (n=23)	56,5% ^a (13/23)	100% ^a (23/23)	26% ^a (6/23)
Total (n=46)	52,2% (24/46)	95,6% (44/46)	28,2% (13/46)

Grupo 1: Animais com problema reprodutivo. Grupo 2: Animais sem problema reprodutivo. Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste exato de Fisher (p<0,05).

Tabela 16. Comparação entre os resultados da sorologia e PCR em tecido uterino de BLV.

	Sorologia Positiva	Sorologia Negativa	Total
PCR positiva	24	0	24
PCR negativa	20	2	22
Total	44	2	46

Sensibilidade: 54,5% IC_{95%} (54,5%-38,8%) Especificidade: 100% IC_{95%} (15,8-100%).

A PCR em tempo real detectou DNA de *Tritrichomonas foetus* em 95,6% (44/46) das amostras de biópsia uterina (Figura 6). O sequenciamento identificou *Tritrichomonas foetus*, mas também *Trichomonas gallinae* e *Simplicimonas similis*. Não houve associação entre a detecção de *Tritrichomonas foetus* e a presença de problema reprodutivo (Tabela 15).

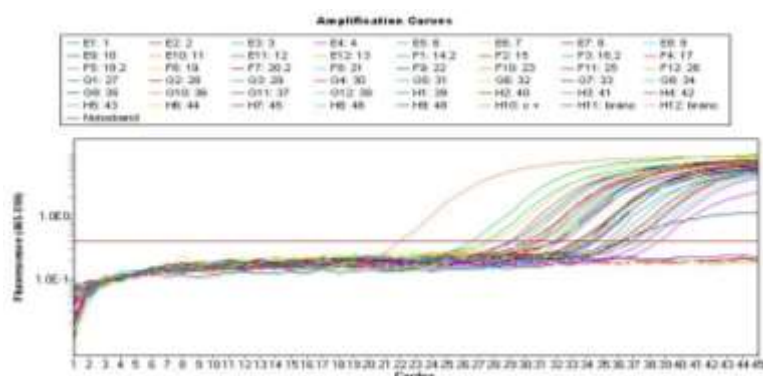


Figura 6. Curvas de amplificação de DNA de *Tritrichomonas foetus* em amostras de biópsia uterina.

Detectou-se DNA de *Escherichia coli* em 28,2% das amostras de útero através da PCR convencional (Fig. 7). O sequenciamento dos produtos de PCR demonstrou similaridade de 91-100% com sequências do 16S RNA ribossomal de *E. coli* (GenBank: KM5049997.1; KM244796.1; AY098487.1). Não houve diferença de detecção entre os grupos com e sem problema reprodutivo (Tab. 15).

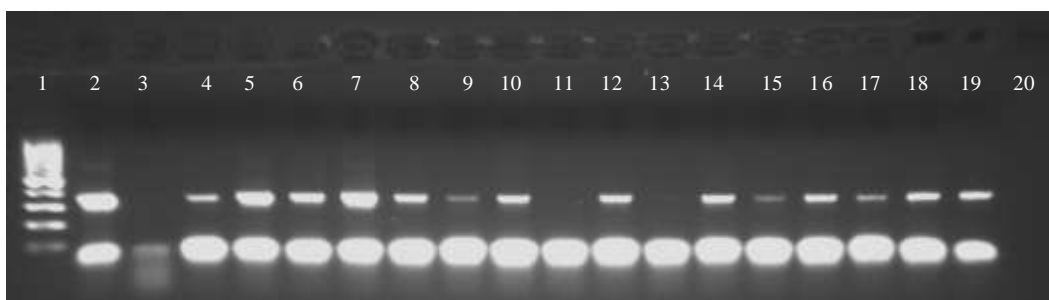


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do DNA de *Escherichia coli* em amostras de biópsia uterina. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: Controle positivo, canaleta 3: controle negativo, canaleta 4-20: amostras de DNA uterino.

5.6 Detecção do agente no tecido uterino e presença de corpo lúteo ovariano

Com o objetivo de avaliar a possível interferência da fase do ciclo estral da vaca na detecção de agentes infecciosos no útero, avaliou-se se houve diferença na detecção dos agentes no útero em animais possivelmente no diestro (com corpo lúteo) e em outras fases do ciclo estral (sem corpo lúteo). Estatisticamente, os agentes detectados no útero ocorreram independentemente da presença ou ausência de corpo lúteo (Tab. 17).

Tabela 17. Relação entre detecção do agente infeccioso no tecido uterino e presença de corpo lúteo ovariano

	BLV	<i>E. coli</i>
CL presente	53,3% ^a (16/30)	33,3% ^a (10/30)
CL ausente	50% ^a (8/16)	18,75% ^a (3/16)

CL: corpo lúteo ovariano. Letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste exato de Fisher ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1 BoHV-1

A ocorrência de 50% dos animais sorologicamente positivos coincide com os dados descritos na literatura em outros rebanhos do estado, que apresentaram ocorrências variando de 29,14% até 68% (Castro *et. al*, 1992; Rocha *et. al*, 2001; Konkad, 2003; Melo *et. al*, 2004; Lima *et. al*, 2011; Ferreira, 2012). A ocorrência menor na propriedade C provavelmente ocorreu devido ao fato de que esta propriedade mantém seu rebanho fechado, sem entrada de animais latentemente infectados, que atuam como fonte de transmissão.

Não se verificou relação entre a sorologia e a ocorrência de problema reprodutivo, semelhante a outros estudos, os quais não encontraram associação com o aumento na taxa de aborto, número de inseminações por concepção, intervalo entre partos e queda na taxa de concepção (Hage *et. al*, 1998; Falva, 2001; Magaña-Urbina *et. al*, 2005; Waldner, 2005; Ata *et. al*, 2006; Lassen *et. al*, 2012). Isto pode ter ocorrido porque no presente e os demais trabalhos avaliaram animais sorologicamente positivos, sem avaliar no momento da infecção ativa. Raaperi *et. al* (2012) e Lassen *et. al* (2012) verificaram aumento do risco de ocorrência de aborto e número de inseminações/concepção em rebanhos com prevalência moderada (até 49%), devido ao maior número de animais soronegativos susceptíveis e que poderiam se infectar e apresentar infecção ativa durante a gestação.

A detecção de BoHV-1 no útero já foi descrita em alguns trabalhos em que se realizou inoculação intrauterina do vírus via sêmen, o que resultou em endometrite e isolamento do vírus (Miller, 1984; Miller, 1987; Bielanski, 2014). Outro trabalho conseguiu realizar o isolamento do BoHV-1 no útero de

vacas infectadas experimentalmente por via intravenosa na fase aguda e durante a reativação da latência por dexametasona (Miller, 1987). No presente trabalho, as vacas eram naturalmente infectadas e não foram submetidas às condições de estresse ou de imunossupressão. Assim, o mais provável é que o vírus se encontrava em estado de latência nos gânglios neuronais periféricos (Muylkens *et. al.*, 2007), por isso não foi possível a detecção do DNA viral no útero através da PCR.

6.2 BVDV

A ocorrência de BVDV nos três rebanhos foi de 13%, sendo que as propriedades A e B apresentaram ocorrência estatisticamente semelhante, 25 e 30% respectivamente, e a propriedade C não apresentou animais positivos. A frequência de animais positivos quando analisados os rebanhos A e B, é semelhante a outros trabalhos realizados em Minas Gerais, cujas ocorrências variaram entre 28,3 a 62% (Castro *et. al.*, 1992; Figueiredo *et. al.*, 1997; Melo *et. al.*, 2004; Samara *et. al.*, 2004; Mineo *et. al.*, 2006). A ausência de animais negativos no rebanho C pode ter ocorrido devido o manejo sanitário empregado com permanência do rebanho fechado (Houe, 1999).

Não houve diferença estatística entre a sorologia positiva e a presença de problema reprodutivo e isto pode ter ocorrido devido à endemicidade da infecção nos rebanhos analisados, o que faz com que os animais apresentem imunidade, diminuindo assim a ocorrência de perdas reprodutivas (Lopes, 2007). A literatura apresenta resultados conflitantes, com alguns autores que não encontraram influência negativa da infecção em relação à presença de problemas reprodutivos (Mineo *et. al.*, 2006; Asmare *et. al.*, 2013), abortos (Waldner, 2005; Stahl *et. al.*, 2006; Lassen *et. al.*, 2012; Sanhueza *et. al.*, 2013), natimortos (Lassen *et. al.*, 2012), idade ao primeiro parto (Gates *et. al.*, 2013), absorção embrionária (Rüfenacht *et. al.*, 2001; Stahl *et. al.*, 2006), número de inseminações por prenhez (Valle *et. al.*, 2001; Lopes, 2007) e intervalo entre partos (Valle *et. al.*, 2001; Lassen *et. al.*, 2012). A permanência de animais persistentemente infectados de 50 dias antes da estação de monta a até 5 meses de gestação não interferiu no desempenho reprodutivo de um grupo de novilhas soronegativas (Rodning *et. al.*, 2012). Outros trabalhos observaram aumento na idade ao primeiro parto em novilhas congenitamente infectadas (Muñhoz-Zanzi *et. al.*, 2004) ou infectadas até os dois anos de idade (Valle *et. al.*, 2001), aumento na taxa de retorno ao cio (Robert *et. al.*, 2004) e aborto (Rüfenacht *et. al.*, 2001; Konrad, 2003). Em animais experimentalmente infectados, BVDV foi identificado nos folículos ovarianos, diminuindo a qualidade dos oócitos e promovendo ooforite, diminuindo o número de embriões e reduzindo a secreção de estrógeno e hormônio luteinizante (Fray *et. al.*, 2000a; McGowan *et. al.*, 2003).

Não foi identificado RNA viral em nenhuma amostra de útero. Não há na literatura trabalhos em que se pesquisou o agente no útero, a detecção já foi verificada apenas em tecidos linfoides (Seong *et. al.*, 2015) e ovário de animais experimentalmente infectados (Grooms *et. al.*, 1998; Fray *et. al.*, 2000a; McGowan *et. al.*, 2003). Por outro lado, em animais PI já se detectou o antígeno viral através de imunohistoquímica na mucosa e vasos uterinos (Fray *et. al.*, 1998; Fredriksen *et. al.*, 1999; Taekyun *et. al.*, 2001). Fredriksen *et. al.* (1999) sugere até que a identificação do BVDV nas glândulas e musculatura endometrial possa estar envolvida na transmissão transplacentária do vírus em vacas PI. No presente trabalho as vacas eram naturalmente infectadas, sem se poder afirmar se estavam ou não durante a infecção ativa e não foi pesquisado se algum dos animais do trabalho eram persistentemente infectadas por BVDV.

6.3 BLV

A elevada ocorrência (95,65%) de animais sorologicamente positivos para BLV entre os animais estudados foi superior aos resultados recentes realizados em Minas Gerais, que variaram entre 56,8% e 79,7% (Camargos *et. al.*, 2002; Rajão *et. al.*, 2014). Entre as três propriedades, não houve diferença, o que demonstra que a leucose enzoótica bovina encontra-se amplamente disseminada entre os rebanhos leiteiros, e que práticas comuns nas propriedades como compartilhamento de agulhas, material cirúrgico, tatuadores e luva de palpação são eficientes em disseminar o vírus para grande número dos animais do rebanho (Dimmock *et. al.*, 1991).

A sorologia positiva para BLV, mesmo na presença do agente no útero, não influenciou na ocorrência de problemas reprodutivos, assim como em outros estudos que não encontraram associação com o aumento do intervalo entre partos (Huber *et. al.*, 1981; D'angelino *et. al.*, 1998; Kale *et. al.*, 2007), dias em aberto

(Huber *et. al.*, 1981; Brenner *et. al.*, 1989) e no número de inseminações por concepção (Kale *et. al.*, 2007). Ineficiência reprodutiva também não foi considerada a principal causa de descarte de vacas sorologicamente positivas (Tiwari *et. al.*, 2005). No entanto, ainda não há um consenso na literatura quanto ao papel da leucose na reprodução. O intervalo entre partos pode ser de 0,47% maior em vacas soropositivas, independentemente da presença de linfocitose persistente (Heald *et. al.*, 1992; Pollari *et. al.*, 1992). A infecção por BLV também pode aumentar a chance (1,66 vezes) de ocorrência de intervalo entre partos superior a 484 dias, sendo este longo intervalo associado às perdas fetais, além de aumentar a ocorrência de cistos ovarianos (Jacobs *et. al.*, 1991; Vanleeuwen *et. al.*, 2010). Os resultados conflitantes do presente estudo e dos demais da literatura provavelmente ocorrem devido à diferença de delineamento dos trabalhos e também à heterogeneidade de apresentação clínica da doença no rebanho (Da *et. al.*, 1993).

Foi possível identificar através da *nested*PCR, DNA proviral de BLV em 52,2% (24/46) das amostras de tecido uterino. Utilizando a mesma técnica de PCR, Klintevall *et. al.* (1994) identificou BLV em 100% (5/5) úteros de bezerras experimentalmente infectadas. Entretanto, Reinacher *et. al.* (1989) não identificou a proteína gp51 do BLV em amostras de útero de dez vacas sorologicamente positivas, e Yagui *et. al.* (2008) também não identificou DNA proviral no útero de quatro fêmeas infectadas por BLV. Esta não detecção provavelmente se deve à baixa sensibilidade dos testes utilizados e devido a uma variação individual, visto que no presente trabalho, somente 54,5% dos animais sorologicamente positivos tiveram a detecção de DNA proviral no útero.

O útero é um sítio comum de desenvolvimento de linfossarcoma em animais infectados por BLV Järplid (1990) citado por Klintevall *et. al.* (1994). Em um estudo retrospectivo, Burton *et. al.* (2010) descreveu a presença de linfossarcoma no útero em 38% (40/105) dos animais necropsiados com neoplasia. No Brasil, Boabaid (2011) identificou linfossarcoma no útero em 43,3% (13/30) animais infectados por BLV e Silva *et. al.* (2008) realizou o relato de caso de um animal infectado por BLV apresentando massa tumoral em diversos órgãos, dentre eles, o útero.

A transmissão transplacentária de BLV já foi descrita em diversos trabalhos. Através de testes sorológicos em bezerros não colostrados, detectaram-se anticorpos em frequências variando entre 3,8% e 26% (Jacobsen *et. al.*, 1983; Kono *et. al.*, 1983; Thurmond *et. al.*, 1983; Ohshima *et. al.*, 1984; Agresti *et. al.*, 1993). Ohshima *et. al.* (1982) descreveu a presença de anticorpos em 33,3% (5/15) dos fetos provenientes de vacas positivas, com a presença de um caso de linfossarcoma no útero e feto correspondente. Em um trabalho recente, Mekata *et. al.* (2014) identificou que a transmissão transplacentária ocorreu em 10,8% dos bezerros, e essa forma de transmissão foi influenciada pela carga viral materna. Outros trabalhos, entretanto, não relatam a ocorrência de transmissão transplacentária (Van Der Maaten *et. al.*, 1981b; Meas *et. al.*, 2002; Yagui *et. al.*, 2008). Como não há estudos comprovando a presença de BLV no sêmen e embriões (Roberts *et. al.*, 1982; Iets, 1998), novos estudos devem ser realizados com o objetivo de investigar a participação do útero na transmissão transplacentária do vírus.

6.4 BTV

O presente trabalho encontrou uma soroprevalência elevada (89,1%) nos três rebanhos pesquisados, demonstrando que o vírus encontra-se altamente disseminado nos rebanhos estudados. Outros trabalhos realizados no estado, utilizando o a mesma técnica diagnóstica, detectaram também ocorrências elevadas, variando entre 59,51 a até 76,3% dos animais testados (Moreira *et. al.*, 1980; Castro *et. al.*, 1992; Konrad *et. al.*, 2003). Entretanto, Campbell *et. al.* (1985) afirma que o IDGA pode apresentar reações cruzadas com outros Orbivírus.

O presente trabalho não encontrou associação da sorologia positiva para BTV e a ocorrência de problema reprodutivo. Utilizando metodologia semelhante, outros trabalhos não encontraram associação da sorologia com o aumento da ocorrência de abortos, natimortos, repetição de cio, intervalo entre partos e período de serviço (Uhaa *et. al.*, 1990; Konrad, 2003; Konrad *et. al.*, 2003; Elhassan *et. al.*, 2014). Isto pode ter ocorrido porque os animais do presente estudo e dos demais citados, investigaram animais com sorologia positiva, não sendo possível afirmar se estes apresentavam infecção ativa, e sabe-se que o alto título de anticorpos pode permanecer por até três anos após a infecção pelo vírus (Pearson *et. al.*, 1979). A influência do BTV durante episódios de infecção ativa em surtos em condições naturais por BTV-8 e

experimentais já foram descritas por outros trabalhos que detectaram aumento na taxa de aborto, número de inseminações por concepção, retorno ao cio, morte fetal (75-200 dias de gestação), idade ao primeiro parto e nascimento de bezerras prematuras (Concha-Bermejillo *et. al.*, 1994; Elbers *et. al.*, 2008; Elbers *et. al.*, 2009; Santman-Berends *et. al.*, 2010; Nusinovici *et. al.*, 2012b; Nusinovici *et. al.*, 2012a; Zanella *et. al.*, 2012; Marceau *et. al.*, 2014).

Não foi detectado RNA viral em nenhuma amostra de útero. Isso pode ter ocorrido caso os animais do presente estudo não estivessem durante infecção ativa. Os trabalhos em que se identificou o vírus no útero através de isolamento em vacas, hibridização *in situ* em cadelas e RT-PCR em cabras, foram realizados a partir de animais infectados experimentalmente (Concha-Bermejillo *et. al.*, 1994; Brown *et. al.*, 1996; Coetzee *et. al.*, 2013).

6.5 *Leptospira interrogans*

Nas três propriedades estudadas, houve uma alta detecção de aglutininas contra leptospiras da sorovariedade *hardjo*, semelhante ao observado em outros trabalhos no estado (Morais, 1994; Araújo *et. al.*, 2005; Nicolino, 2011). As amostras *HardjoBovis* e *HardjoOMS* apresentaram distribuição igual entre as três propriedades. Já para a amostra *HardjoCTG* houve maior soropositividade na propriedade B em relação a C e para *Bolivia* da A em relação à C, ambas as amostras foram isoladas em Minas Gerais (Morais, 1994; Chiareli *et. al.*, 2012), indicando que estes sorovares estão presentes em diferentes rebanhos do estado. O sorovar *wolffi* também foi mais frequente na propriedade B em relação à propriedade C, e este resultado pode ter ocorrido devido às reações sorológicas cruzadas com a sorovariedade *hardjo*, ambas pertencentes ao mesmo sorogrupo *Serjoe* (Girio *et. al.*, 1988). O sorovar *bratislava* foi frequente nas três propriedades, com até 41,6% dos animais positivos, e isso pode ter ocorrido pela presença de equinos ou suínos portadores, que são hospedeiros preferenciais desta sorovariedade (Bernard, 1993; Mousing *et. al.*, 1995). Os sorovares *hebdomadis*, *pomona* e *eicterohaemorrhagiae* foram encontrados em pequena proporção, semelhante ao que foi descrito em outros inquéritos sorológicos de bovinos (Araújo *et. al.*, 2005; Mineiro *et. al.*, 2007; Castro *et. al.*, 2008).

Não houve relação de problema reprodutivo e sorologia contra nenhuma sorovariedade, diferente por descrito em outros trabalhos (Dhaliwal *et. al.*, 1996c; Guítian *et. al.*, 1999; Langoni *et. al.*, 1999; Konrad, 2003; Atxaerandio *et. al.*, 2005; Escamilla *et. al.*, 2007; Pivetta, 2009). A razão dessa divergência pode ter ocorrido caso os animais do presente estudo não estivessem durante a infecção ativa. Apesar do teste de aglutinação microscópica detectar IgM, a primeira imunoglobulina produzida., os bovinos são hospedeiros adaptados ao sorovar *hardjo* (o mais frequente nos animais do presente estudo), e com isso a infecção pode possuir um caráter crônico, com respostas sorológicas variáveis entre os animais, com alguns demonstrando aumento do título e outros permanecendo soronegativos. (OIE, 2010).

A qPCR para *L. interrogans* não identificou DNA em nenhuma amostra de útero. Entretanto, *Leptospira* já foi isolada do útero em vacas e porcas naturalmente infectadas (Ellis *et. al.*, 1986; Bolin *et. al.*, 1992) e em experimentalmente inoculadas via intrauterina, intranasal e supraconjuntival e em lavados uterinos (Bielanski *et. al.*, 1998). Em condições naturais, o sêmen pode servir como uma fonte de infecção uterina, pois a bactéria já foi detectada no sêmen bovino (Eaglesome *et. al.*, 1992; Heinemann *et. al.*, 2000) e em secreção vaginal de éguas, cabras, ovelhas e vacas (Dhaliwal *et. al.*, 1996a; Lilenbaum *et. al.*, 2008; Hamond *et. al.*, 2014). Entretanto, sabe-se que há a presença de IgG e IgA específicas para *Leptospira* no muco cervicovaginal em vacas naturalmente infectadas, e essas imunoglobulinas podem atuar debelando a infecção, semelhante ao que ocorre para *C. foetus* (Stoessel, 1982). Os animais do presente estudo poderiam não estar durante a infecção ativa no momento da coleta, o que pode ter resultado na falha de detecção do DNA bacteriano.

6.6 *Escherichia coli*

A detecção de *E. coli* ocorreu em 26,8% das amostras do presente estudo, em vacas fora do período puerperal, o que condiz com o valor médio encontrado entre os trabalhos da literatura, os quais apresentam valores de detecção conflitantes devido à diferença de delineamentos experimentais e técnicas diagnósticas utilizadas. Em torno dos 40 dias, isolou-se a partir de citologias em 4,6% e 27,12% (Galindo

et. al., 2003; Baránski *et. al.*, 2012) e em 62% amostras de biópsia uterina (Bonnett *et. al.*, 1993). Utilizando a mesma técnica de PCR deste estudo, Bicalho *et. al.* (2010) detectou *E.coli* em 33,4% a partir de suabes em vacas na primeira semana pós-parto.

Não foi detectada influência da presença de *E. coli* no útero e problema reprodutivo, o que condiz com outros trabalhos que também não encontraram associação com o número de dias em aberto, número de inseminações por prenhez e porcentagem de vacas prenhes no rebanho (Bonnett *et. al.*, 1993; Huszenicza, 1999; Baránski *et. al.*, 2012). Galindo *et. al.* (2003) não verificou diferença entre animais normais e vacas repetidoras de cio. Outros trabalhos, entretanto, afirmam que a presença de *E. coli* no útero diminui a probabilidade das vacas engravidarem em até 9,2 vezes (Bicalho *et. al.*, 2010; Bicalho *et. al.*, 2012). Sabe-se também que infecções uterinas bacterianas, dentre elas por *E. coli*, influenciam a função ovariana: prolongando a fase luteal, diminuindo o número de folículos, o tamanho do corpo lúteo, a produção de estrógeno e progesterona e a resposta ovariana ao hormônio luteinizante (Mateus *et. al.*, 2002; Williams, 2007). O papel da *E. coli* na reprodução provavelmente diferiu entre os trabalhos pois o desenvolvimento de doença clínica não depende unicamente da detecção do agente, mas também do sistema imune da vaca e patogenicidade das bactérias às quais o animal foi exposto (Sheldon, 2006).

6.7 *Campylobacter fetus*

O *Campylobacter fetus* não foi detectado em nenhuma amostra uterina, e na fazenda C isso pode ser explicado pela utilização de inseminação artificial, o que reduz o risco de infecção devido ao controle sanitário dos touros doadores. Nas outras propriedades além de não haver sinais de doença clínica evidente, a não detecção pode ter ocorrido caso nenhuma das vacas estivesse com infecção recente, pois se sabe que vacas infectadas apresentam infertilidade temporária e normalmente, após 3 a 5 meses desenvolvem imunidade de mucosas (principalmente IgA), debelando a infecção (Stoessel, 1982).

6.8 *Tritrichomonas foetus*

A qPCR utilizada detectou *Tritrichomonas foetus* em 95,6% dos animais estudados e o sequenciamento não foi conclusivo, por isso, esse resultado expressivo deve ser interpretado com cautela. A PCR detectou grande positividade na propriedade C, que relata o uso exclusivo de inseminação artificial, e sabe-se que empresas de venda de sêmen devem realizar exame periódico de tricomonose nos reprodutores (Brasil, 2003). Além disso, nas outras propriedades que utilizam monta natural, não há uma evidência clínica de tricomonose, pois em rebanhos infectados os ciclos estrais são prolongados em até 50-70 dias, com grande número de animais repetindo o cio e redução de 20 a 40% na prenhez (Pellegrin, 2003). Com isso, provavelmente, o grande número de resultados positivos na PCR pode ter ocorrido devido a uma falha na especificidade da PCR empregada neste estudo, identificando outros *Trichomonas* presentes nas fezes e que podem eventualmente contaminar o útero.

6.9 *Neospora caninum*

A frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* foi de 21,7%, semelhante a outros trabalhos realizados no estado de Minas Gerais, com frequências variando de 12,61 a 46,25% (Melo *et. al.*, 2004; Santos *et. al.*, 2009; Nicolino, 2011; Bruhn *et. al.*, 2013). A ocorrência na fazenda A foi superior às demais, provavelmente devido às falhas de práticas de manejo sanitário, associada à alta taxa de transmissão transplacentária em um rebanho infectado. Sabe-se que propriedades com presença de cães soltos, com associação ao não enterramento das placentas leva a um maior número de animais sorologicamente positivos para o parasita (Bruhn *et. al.*, 2013). No entanto, a principal via de disseminação do parasita é a partir da infecção transplacentária (Magalhães *et. al.*, 2014).

Não houve associação da ocorrência de problemas reprodutivos e a infecção por *N. caninum*. Este resultado conflita com outros trabalhos de diversos países que afirmam que a infecção por *N. caninum* aumenta a ocorrência de abortos (Thurmond *et. al.*, 1997; López-Gatius *et. al.*, 2004a; Garcia-Vasquez *et. al.*, 2005; Waldner, 2005; Corbellini *et. al.*, 2006; Stahl *et. al.*, 2006; González-Warleta *et. al.*, 2008; Galvão *et. al.*, 2011; Lassen *et. al.*, 2012; Sanhueza *et. al.*, 2013; Mazuz *et. al.*, 2014) e também de natimortalidade (Galvão *et. al.*, 2011; Lassen *et. al.*, 2012). O presente estudo pode não ter encontrado

associação estatística devido ao delineamento experimental utilizado, em que um número muito pequeno de animais (10/46) eram soropositivos para o agente, dificultando a análise estatística.

Não houve detecção do agente no útero de animais infectados. Entretanto, a detecção por PCR já foi descrita em lavados uterinos e útero de animais experimentalmente infectados e já foi descrito a visualização por imunohistoquímica de taquizoítos e cistos no útero de fêmeas gestantes ou não (Serrano *et. al.*, 2006; Silva *et. al.*, 2012; Orozco *et. al.*, 2013). No presente estudo, a não detecção do agente pode ter ocorrido por uma limitação da técnica de biópsia, que retira um fragmento muito pequeno de tecido uterino, e sabe-se que o número de cistos do parasita no útero é pequeno (Orozco *et. al.*, 2013).

6.10 Detecção do agente no tecido uterino e presença de corpo lúteo ovariano

A concentração de estrógeno e progesterona tem papel importante na imunidade uterina. Durante a fase folicular, com aumento na secreção de estrógeno, há um aumento no aporte sanguíneo ao útero, produção de muco e atividade de polimorfonucleares; já na fase progesterônica todas essas ações são consideravelmente inibidas (Dhaliwal *et. al.*, 2001). No entanto, não houve essa diferença de detecção entre os animais com e sem corpo lúteo ovariano.

Não se pode afirmar o motivo disto, visto que não foi realizada a quantificação das concentrações de estrógeno e progesterona circulantes no momento da biópsia e não há na literatura trabalhos que discutam especificamente a imunidade uterina em diferentes fases do ciclo frente a agentes infecciosos.

7. CONCLUSÕES

Os rebanhos leiteiros estudados apresentaram elevado número de animais soropositivos para BLV e BTV com ocorrência moderada para BoHV-1, BVDV, *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans*. Outros fatores não infecciosos podem atuar como fatores causadores de falhas reprodutivas, atuando como fatores de confundimento no presente trabalho.

Não houve detecção de BoHV-1, BVDV, BTV, *Campylobacter fetus*, *Leptospira interrogans*, *Tritrichomonas foetus* e *Neospora caninum* no útero e isso pode ter ocorrido devido à patogenia da infecção pelos agentes, com ausência de infecção aguda no momento da coleta, devendo ser realizados novos estudos avaliando a presença do agente no útero em animais durante a infecção ativa.

Este é o primeiro trabalho com detecção de BLV e *E. coli* no útero por técnicas moleculares em vacas no diestro. O impacto destes agentes altamente disseminados nos rebanho na reprodução bovina ainda não foi completamente esclarecido. Sendo assim, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de investigar a influência destes agentes presentes no útero em vacas clinicamente normais no desempenho reprodutivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M.;ENGELS, M. Pro and contra IBRRadication. *Veterinary Microbiology*, v.113, p.293-302,2006.
- ADLER, B. M., A.P. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, v.140, p.287-296,2010.
- AGNEW, D. W.; MUNSON, L.;COBO, E. R. *et. al.* Comparative histopathology and antibody responses of non-Tritrichomonas foetus trichomonad and Tritrichomonas foetus genital infections in virgin heifers. *Veterinary Parasitology*, v.151, p.170-189,2008.
- AGRESTI, A.;PONTIL, W.;ROCCHI, M. Use of polymerase chain reaction to diagnose Bovine Leukemia Virus infection in calves at birth. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, n.3 (mar 1993), p.373-378,1993.
- ALI, H.; ALI, A. A.; ATTA, M. S. Common, Emerging, Vector-Borne and Infrequent Abortogenic Virus Infections of Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.59, p.11-25,2012.
- ALMERÍA, S.;ARAUJO, S.;TUO, W. *Parasitology*, v.169, p.304-311,2010.

- ANDERSON, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, v.68, p.474-486,2007.
- ARAÚJO, V. E. M.;MOREIRA, E. C.;NAVEDA, L. A. B. *et. al.* Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootécnica*, v.57, n.4, p.430-435,2005.
- ASMARE, K.;REGASSA, F.;ROBERTSON, L. J. *et. al.* Reproductive disorders in relation to *Neospora caninum*, *Brucella spp.* and bovine viral diarrhoea virus serostatus in breeding and dairy farms of central and southern Ethiopia. *Epidemiology & Infection*, v.141, p.1772-1780,2013.
- ATA, A.;KALE, M.;YAVRU, S. *et. al.* The effect of subclinical bovine herpesvirus 1 infection on fertility of cows and heifers. *Acta Veterinaria (Beograd)*, v. 56, n.2-3, p. 267-273,2006.
- ATXAERANDIO, G.;ADURIZ, G.;ZILUAGA, I. Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar *Bratislava* infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. *The Veterinary Record*, v.156, p.376-380,2005.
- AYALON, N. A review of embryonic mortality in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p.483-493,1978.
- BARÁNSKI, W.;PODHALICKZ-DZIEGIELEWSKA, M.;ZDUNCZYK, S. *et. al.* The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology*, v.78, p.1939-1947,2012.
- BAUERMANN, F. V.;RIDPATH, J. F.;WEIBLEN, R. *et. al.* HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.25, n.1, p.6-15,2013.
- BAXI, M. M., D.; BAXI, S. *et. al.* A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. *Veterinary Microbiology*, v.116, 37-44,2006.
- BERGAMASHI, M. A. C. M.;MACHADO, R.;BARBOSA, R. T. Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras. *Circular Técnica*, v.64, p.12,2010.
- BERGLUND, B.;STEINBOCK, L.;ELVANDER, M. Causes of Stillbirth and Time of Death in Swedish Holstein Calves Examined Post Mortem. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.44, p.111-120,2003.
- BERNARD, W. V. Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.9, n.2, p.435-444,1993.
- BICALHO, M. L. S.;MACHADO, V. S.;OIKONOMOU, G. *et. al.* Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Veterinary Microbiology*, v.157, p.125-131,2012.
- BICALHO, R. S.;MACHADO, V. S.;BICALHO, M. L. S. *et. al.* Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli* *Journal of Dairy Science*, v.93, p.5818-5830,2010.
- BIELANSKI, A.;ALGIRE, J.;LALONDE, A. *et. al.* Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, v.71, p.499-508 2009.
- BIELANSKI, A.;GHAZI, D. F.;PHIPPS-TOOD, B. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos in vitro in the presence of *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology*, v.61, p.821-829,2004.
- BIELANSKI, A.;SURUJBALLI, O.;GOLSTEYN THOMAS, E. *et. al.* Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjobovis*. *Animal Reproduction Science*, v.54, p.65-73,1998.
- BIELANSKI, A. A., J.; LALONDE, A. *et. al.* Risk of Transmission of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) by Infected Semen to Embryo Recipients and Offspring. *Reprod. Dom. Anim.*, v.49, p.197-201,2014.
- BISWASA, S.;BANDYOPADHYAY, S.;DIMRIA, U. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) – a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Veterinary Quarterly*, v.33, n.2, p.68-81,2013.
- BIUK-RUDAN, N.;CVETNIC, S.;MADIC, J. *et. al.* Prevalence of antibodies to IBR and BVDV viruses in dairy cows with reproductivers disorders. *Theriogenology*, v.51, p.875-881,1999.
- BJÖRKMAN, C.;MCALLISTER, M. M.;FRÖSSLING, J. *et. al.* Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.15, p.3-7,2003.

- BOABAID, F. M. Achados clínicos e patológicos da Leucose Bovina Enzoótica. 2011. 72p. Mestrado em Ciências Veterinárias. - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BOLIN, C. A.; CASSELS, J. A. Isolation of *Leptospira interrogans* serovars bratislava and hardjo from swine at slaughter. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.4, p.87-89,1992.
- BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: Natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.21, p.383-408,2005.
- BONNETT, B. N.; MARTIN, S. W.; MEEK, A. H. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v.15, p.205-220,1993.
- BRASIL.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.Instrução normativa n° 48.2003.
- BREARD, E.;HAMBLIN, C.;HAMMOUMI, S. *et. al.* The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Research in Veterinary Science*, v.77, p.1-8,2004.
- BRENNER, J.;VAN-HAAM, M.; SAVIR, D. The implication of BLV infection in the Productivity, Reproductive Capacity and Survival Rate of a Dairy Cow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.22, p.299-305,1989.
- BROWN, C. C.;RHYANM, J. C.;GRUBMAN, M. J. *et. al.* Distribution of Bluetongue Virus in Tissues of Experimentally Infected Pregnant Dogs as Determined by In Situ Hybridization. *Veterinary Pathology*, v.33, p.337-340,1996.
- BRUHN, F. R. P.;DAHER, D. O.;LOPES, E. *et. al.* Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v.45, p.1093-1098,2013.
- BURNY, A.;CLEUTHER, Y.;KETTMANN, R. *et. al.* Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Veterinary Microbiology*, v.17, p.197-218,1998.
- BURTON, A. J.;NYDAM, D. V.;LONG, E. D. Signalment and Clinical Complaints Initiating Hospital Admission, Methods of Diagnosis, and Pathological Findings Associated with Bovine Lymphosarcoma (112 Cases). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.24, p.960-964,2010.
- CAMARGOS, M. F.;MELO, C. B.;LEITE, R. C. Frequência de soropositividade para a Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos de Minas Gerais. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.5, p.20-26,2002.
- CAMARGOS, M. F.;REIS, J. K. P.;LEITE, R. C. Bovine Leukemia Virus. *Virus Rev Res*, v.9, n.1, p.44-59,2004.
- 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.
- CARVALHO, B. C. Parâmetros reprodutivos, metabólitos e produção de leite de vacas mestiças Holandês x Zebu submetidas a dois manejos pré-parto. 2009. 193 p. Tese.Doutorado em Medicina Veterinária. - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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. *Tropical Animal Health and Production*, v.24, p.173-176,1992.
- CASTRO, V.;AZEVEDO, S. S.;GOTTI, T. B. *et. al.* Soroprevalência da Leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.1, p.3-11 (jan/mar),2008.
- CHAPWANYA, A.;MEADE, K. G.;NARCIANDI, F. *et. al.* Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, v.73, p.988-994,2010.
- CHIARELLI, D.;COSATE, M. R. V.;MOREIRA, E. C. *et. al.* Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.7, p.633-639,2012.
- COBO, E. R.;CAMPERO, C. M.;GIMENO, E. J. *et. al.* Lectin Binding Patterns and Immunohistochemical Antigen Detection in the Genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected Heifers. *Journal Comparative Pathology*, v.131, p.127-134,2004a.
- COBO, E. R.;MORSELLA, C.;CANO, D. *et. al.* Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology*, v.62, p.1367-1382,2004b.

COETZEE, P.;STOKSTAD, M.;MYRMEL, M. *et. al.* Transplacental infection in goats experimentally infected with a European strain of bluetongue virus serotype 8. *The Veterinary Journal*, v.197, p.335-341,2013.

CONCHA-BERMEJILLO, A.;ODEON, A.;BONDURANT, R. H. *et. al.* Experimental infection of pregnant cattle with bluetongue virus serotype 11 between postbreeding days 21 and 48. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.5, p.329-335,1994.

CORBELLINI, L. G.;PESCADOR, C. A.;FRANTZ, F. *et. al.* Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *The Veterinary Journal*, v.172, p.114-120,2006.

COSTA, J. R. R. Língua azul: produção e padronização de antígeno para prova de imunodifusão em gel de ágar e prevalência nas mesorregiões sudoeste e sudeste do estado do Rio Grande do Sul. 2000. 39p. Dissertação.Mestrado em Medicina Veterinária. - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

D'ANGELINO, J. L.;GARCIA, M.;BIRGEL, E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. *Journal of Dairy Research*, v.65, P.693-695,1998.

D'APICE, M. Ocorrência do aborto no Estado de São Paulo devido ao *Vibrio fetus*. *Biológico*, v.22, p.15-18,1956.

D'ARCE, R. C. F.;ALMEIDA, R. S.;SILVA, T. C. *et. al.* Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, v.88, p.315-324,2002.

DA, Y.;SHANKS, R. D.;STEWART, J. A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 14, p.6538-6541,1993.

DAL POZZO, F.;SAEGERMAN, C.;THIRY, E. Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on European serotype 8. *The Veterinary Journal*, v.182, p.142-151,2009.

DAVISON, H. C.;OTTER, A.;TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol*, v.29, p.1683-1689,1999.

DEMAULA, C. D.;LAUTENEGGER, C. M.;BONEAU, K. R. *et. al.* The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology*, v.296, n.2, p.330-337, 2002.

DHALIWAL, G. S.;MURRAY, R. D.;DOBSON, H. *et. al.* Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds naturally infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Research in Veterinary Science*, v.60, p.163-167,1996a.

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. *The Veterinary Record*, v.139, p.110-114,1996b.

DHALIWAL, G. S.;MURRAY, R. D.;ELLIS, A. Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* relative to the year of diagnosis. *The Veterinary Record*, v.23, p.272-276,1996c.

DHALIWAL, G. S.;MURRAY, R. D.;WOLDEHIWET, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal Reproduction Science*, v. 67, p.135-152,2001.

DIJKSTRA, T. H.;EYSKER, M.;SCHARES, G. *et. al.* Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol*, v.31, p.747-752,2001.

DIMMOCK, C. K.;CHUNG, Y.S.; C.;MACKENZIE, A. R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Australian Veterinary Journal*, v.68, n.7, p.230-233,1991.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, n.2, p.260-267,2008.

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

DUBEY, J. P.;SHARES, G. Neosporosis in animals - The last five years. *Veterinary Parasitology*, v.180, p.90-108,2011.

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

- EAGLESOME, M. D.;GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*.*The Veterinary Bulletin*, v.62, p.743-775,1992.
- ELBERS, A. R. W.;BACKX, A.;MERO, E. *et. al.* Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, v.87, p.21-30,2008.
- ELBERS, A. R. W.;VAN DER SPEK, A. N.;VAN RIJN, P. A. Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands in 2007 and a comparison with the situation in 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, v.92, p.1-8,2009.
- ELHASSAN, A. M.;FADOL, M. A.; EL HUSSEIN, A. R. Seroprevalence of Bluetongue Virus in Dairy Herds with Reproductive Problems in Sudan. *ISRN Veterinary Science*, 2014, p.1-4,2014.
- ELLIS, W. A.;SONGER, J. G.;MONTGOMERY, J. *et. al.* Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *The Veterinary Record*, v.118, p.11-13,1986.
- ESCAMILLA, H. P.;MARTÍNEZ, M. J. J.;MEDINA, C. M. *et. al.* Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.71, p.314-317,2007.
- FALVA, C. D. Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados e não infectados pelo Herpesvírus Bovino tipo 1(HVB-1). 2001. 125p. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FAVERO, M.;PINHEIRO, S. R.;VASCONCELLOS, S. A. *et. al.* Leptospirose bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.68, n. 2 (jul/dez), p.29-35,2001.
- FELLEISEN, R. S. J. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes and Infection*, v.1, p.807-816,1999.
- FERNANDES, C. H. C.;MELO, L. E. H.;TENÓRIO, T. G. S. *et. al.* Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região Norte do Estado do Tocantins, Brasil *Arquivos do Instituto Biológico*, v.76, n.3, p.327-334,2009.
- FERREIRA, A. M.;SÁ, W. F.;VETROMILA, M. A. M. Ovulação e gestação de vacas mestiças lado de maior frequência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.23, n.4, p.435-437,1988.
- FERREIRA, A. M. *Reprodução da Fêmea Bovina*. Juiz de Fora: 2010.
- FERREIRA, H. C. C. Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1 e/ou BoHV-5): Vias de eliminação, viremia e sorologia de vacas leiteiras naturalmente infectadas. 2012. 66p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).- Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- FIGUEIREDO, H. C. P.;VIEIRA, T. R.;LAGE, A. P. *et. al.* Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia bovina a vírus (VDBV) em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.4, p.11-15,1997.
- FINO, T. C. M.;MELO, C. B.;RAMOS, A. F. *et. al.* Diarreia bovina a vírus (BVD) : Uma breve revisão. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.34, n. 2 (abr/jun), p.137-146,2012.
- FRAY, M. D.;MANN, G. E.;CLARKE, M. C. *et. al.* Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow. *Veterinary Microbiology*, v.77, p.185-194,2000a.
- FRAY, M. D.;PATON, J. S.;ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.615-627,2000b.
- FRAY, M. D.;PRENTICE, H.;CLARKE, M. C. *et. al.* Immunohistochemical evidence for the localization of Bovine Viral Diarrhea Virus , a single-stranded RNA Virus, in Ovarian Oocytes in the Cow. *Veterinary Pathology*, v.35, p.253-259,1998.
- FREDRIKSEN, B.;PRESS, C. M.;LOKEN, T. *et. al.* Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.109-122,1999.
- GALINDO, A. S. D.;GAMBARINI, M. L.;OLLVEIRA FILHO, B. D. *et. al.* Avaliação microbiológica e citológica do útero de vacas repetidoras de cio *Ars Veterinária*, v.19, n.2, p.179-187,2003.
- GALVÃO, G. S.;GONDIM, L. F. P.;PEREIRA, M. J. S. *et. al.* Soropositividade para *Neospora caninum* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudesde da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.33, n.4, p.234-237,2011.

GARCIA-VASQUEZ, Z.; ROSARIO CRUZ, R.; RAMOS-ARAGON, A *et. al.* *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology*, v.134, p.61-65, 2005.

GARCIA, M. M., BROOKS, B.W. *Campylobacter*. In: IOWA STATE UNIVERSITY PRESS. Pathogenesis of bacterial infections in animals. J. F. Prescott, 1993. p.262-272.

GATES, M. C.; HUMPHRY, R. W.; GUNN, G. J. Associations between bovine viral diarrhoea virus (BVDV) seropositivity and performance indicators in beef suckler and dairy herds. *The Veterinary Journal*, v.198, p.631-637, 2013.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: Situação atual da pesquisa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.1, 2004.

GHALMI, F. C., B.; KAIDI, R.; DAUBE, G.; LOSSON, B. Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. *Veterinary Parasitology*, v.155, p.161-167, 2008.

GIBBS, E. P. J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *The Veterinary Bulletin*, v.47, p.317-343, 1977.

GIBNEY, E. H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A. *et. al.* The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *Int. J. Parasitol*, v.38, p.579-588, 2008.

GIRIO, R. J. S.; MATHIAS, L. Use a saprophytic *Leptospira* strain in the diagnosis of experimental leptospirosis in guinea-pigs. *Revista Insitituto Medicina Tropical de São Paulo*, v.30, n.2, p. 91-94, 1988.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, v.70, p.270-285, 2008.

GOMES, M. J. P.; FERNANDES, J. C. T.; SILVA, C. E. *et. al.* Identificação de *Tritrichomonas foetus* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v.19, p.103-111, 1991.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal of Parasitology*, v.88, p.1159-1163, 2002.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C. *et. al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol*, v.34, p.159-161, 2004.

GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMINDA, J. A.; CASTRO-CORRAL, C. *et. al.* Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Parasitology Research*, v.249, p.102-243, 2008.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.20, p.5-19, 2004.

GROOMS, D. L.; BROCK, K. V.; WARD, L. A. Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest*, v.10, n.2, p.125-129, 1998.

GUÍTIAN, F. J.; THURMOND, M. C.; HIEATALA, S. K. Infertility and abortion among first lactations dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.215, n.4, p.515-518, 1999.

GUVEN, E.; BASTEM, Z.; AVCIOGLU, H. *et. al.* Molecular determination of *Tritrichomonas* spp. in aborted bovine fetuses in Eastern Anatolian Region of Turkey. *Veterinary Parasitology*, v.196, *Veterinary Parasitology* 196 (2013) 278–282, p.278-282, 2013.

HAGE, J. J.; SCHUKKEN, Y. H.; DIJKSTRA, T. H. *et. al.* Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Preventive Veterinary Medicine*, v.34, p.97-106, 1998.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; BREMONT, S. *et. al.* Predominance of *Leptospira interrogans* serovar *Bratislava* DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. *Animal Reproduction Science*, v.151, p.275-279, 2014.

HEALD, M. T. S.; WALTNER-TOWESA, D.; JACOBS, R. M. *et. al.* The prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy cows and associations with farm management practices, production and culling in Ontario *Preventive Veterinary Medicine*, v.14, p.45-55, 1992.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M. *et. al.* Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology*, v.73, p.261-267, 2000.

HOFFER, M. A. Bovine campylobacteriosis: a review. *Canadian Veterinary Journal*, v.22, p.327-330, 1981.

HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R.F. Natural transmission of Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.13, n.1, p.107-127,1997.

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

HUBER, N. L.;DIGIACOMO, R. F.;EVERMANN, J. F. *et. al.* Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: cohort analysis of the prevalence of antibody-positive cows. *American Journal of Veterinary Research*, v.42, p.1471-1476,1981.

HUMBLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*, v.56, p.1417-1433,2001.

HUSZENICZA, G., FODOR, M., GACS, M. Uterine Bacteriology, Resumption of Cyclic Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows kept in Large-Scale Dairy Herds.

IRAOLA, G., HERNANDÉZ, M., CALLEROS, L. Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuse. *Journal of Veterinary Science*, V.13, n.4, P.371-376,2012.

JACOBS, R. M.;HEENEY, J. L.;GODKIN, M. A. *et. al.* Production and related variables in bovine leukaemia virus-infected cows. *Veterinary Research Communications*, v.15, p.463-474,1991.

JACOBSEN, K. L.;BULL, R. W.;MILLER, J. M. *et. al.* Transmission of Bovine Leukemia Virus: Prevalence of antibodies in precolostral calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.1, p.265-272,1983.

JAMALUDDIN, A. A.;CASE, J. T.;HIRD, D. W. Dairy Cattle Abortion in California: Evaluation of Diagnostic Laboratory Data. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.8, p.210-218,1996.

JIMENEZ, D. F., PEREZ, A.M., CARPENTER, T.E. Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, v.101, p.157-162,2011.

JUFFO, G. D. Aborto em bovinos: principais causas infecciosas. 2010. 28p. Monografia (Conclusão de curso em Medicina Veterinária). - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KALE, M.;BULUT, O.;YAPKK, O. *et. al.* Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. *Journal of the South African Veterinary Association*, v.78, n.3, p.130-132,2007.

KLINTEVALL, K.;BALLAGI-PORDÁNY, A.;NASLUND, K. *et. al.* Bovine leukaemia virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology*, v.42, p.191-204,1994.

KONKAD, P. A. Inquérito sorológico de agentes infecciosos que afetam a reprodução de bovinos leiteiros em Minas Gerais, 2001-2002. 2003. 39p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

KONO, Y.;SENTSUI, H.;ARAI, K. *et. al.* Serological methods to detect calves infected in utero with Bovine Leukemia Virus. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, v.45, n.4, p.453-461,1983.

KONRAD, P. A. Inquérito sorológico de agentes infecciosos que afetam a reprodução de bovinos leiteiros em Minas Gerais, 2001 - 2002. 2003. 39p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). - Escola de Veterinária, Minas Gerais, Belo Horizonte.

KONRAD, P. A.;RODRIGUES, R. O.;CHAGAS, A. C. P. *et. al.* Antibodies against the bluetongue virus in dairy cattle in the state of Minas Gerais, Brazil and associations with reproductive problems. *Revista da FVZA*, v.10, n.1, p.117-125,2003.

LAENDER, J. O. Língua Azul em rebanhos ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: Análise da evidência clínica e sorológica e identificação de *Culicoides* sp. 2002. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LAGER, I. A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana*, v.40, n.3, p.89-93,2004.

LANGONI, H.;SOUZA, L. C.;SILVA, A. V. *et. al.* Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v.40, p.271-275,1999.

LASSEN, B.;ORRO, T.;ALEKSEJEV, A. *et. al.* Neospora caninum in Estonian dairy herds in relation to herd size, reproduction parameters, bovine virus diarrhoea virus, and bovine herpes virus 1. *Veterinary Parasitology*, v.190, p.43-50,2012.

LEAL, D. R.;FERNANDES, G. O.;GOUVEIA, F. F. *et. al.* Prevalence of bovine genital Campylobacteriosis and Trichomoniasis in the Federal District and its surroundings. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.36, n.4, p.256-259,2012.

LEEMANS, J.;RAES, M.;VANBISNT, T. *et. al.* Viral RNA load in semen from bluetongue serotype 8-infected rams: relationship with sperm quality. *The Veterinary Journal*, v.192, n.3, p.304-310,2012.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v.4, p.435-448,2004.

LILENBAUM, W.;MARTINS, G. Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.61, n.1, p.63-68,2014.

LILENBAUM, W.;VARGES, R.;BRANDÃO, F. Z. *et. al.* Detection of Leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology*, v.69, n.17, p.837-842,2008.

LIMA, M. S.;NOGUEIRA, A. H. C.;OKUDA, L. H. Pesquisa de Anticorpos contra o Herpesvírus Bovino Tipo 1 em Bovinos no Brasil *Biológico*, v.73, n.2, p.214-218,2011.

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

LINDSAY, D. S.;DUBEY, J. P.;DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v.82, p.327-333,1999.

LOPES, L. B. Análise de índices de produção e reprodução em rebanhos leiteiros canadenses segundo o perfil sorológico para Diarréia Viral Bovina e Leucose Enzoótica Bovina. 2007. 35p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LÓPEZ-GATIUS, F.;LÓPEZ-BÉJAR, M.;MARUGAVEL, K. *et. al.* Neospora-associated Abortion Episode over a 1-Year Period in a Dairy Herd in North-east Spain. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v.51, p.348-352,2004a.

LÓPEZ-GATIUS, F.;PABÓN, M.;ALMERÍA, S. Neospora caninum infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, v.62, p.606-613,2004b.

LÓPEZ-GATIUS, F.;SANTOLARIA, P.;ALMERÍA, S. Neospora caninum Infection Does Not Affect the Fertility of Dairy Cows in Herds with High Incidence of Neospora-associated Abortions. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v.52, p.51-53,2005.

MACLACHLAN, N. J.;CONLEY, A. J.;KENNEDY, P. C. Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.643-651,2000.

MACLACHLAN, N. J.;DREW, C. P.;DARPEL, K. E. *et. al.* The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *Journal of Comparative Pathology*, v.141, p.1-16,2009.

MAGALHÃES, V. C. S.;OLIVEIRA, U. V.;COSTA, S. C. L. *et. al.* Transmission paths of *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.202, p.257-264,2014.

MAGAÑA-URBINA, A.;RIVERA, J. L. S.;SEGURA-CORREA, J. C. Infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds in the Cotzio-Tejaro region of Michoacan, Mexico. *Técnica Pecuaria en México*, v.43, n.1, p.27-37,2005.

MALINEN, E. K., A.; RINTTILA, T.; PALVA, A. . Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, v.149, p.269-277,2003.

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose animal (PNCEBT).2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>

MARCEAU, A.;MADOUASSE, A.;LEHÉBEL, A. *et. al.* Can routinely recorded reproductive events be used as indicators of disease emergence in dairy cattle? An evaluation of 5 indicators during the emergence of bluetongue virus in France in 2007 and 2008. *Journal of Dairy Research*, v.97, p.5135-6150,2014.

MARTINS, N. E. X.;FRESCHI, C. R.;BAPTISTA, F *et. al.* Ocorrência de anticorpos anti-Neospora caninum em vacas lactantes do município de Araguaína, estado do Tocantis, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v.40, n.3, p.231-238,2011.

MARTINS, T. M. Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça holandesa e expressão gênica endometrial de receptores tipo toll e beta-defensina 5 após o parto. 2010. 136 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MATEUS, L.;LOPES DA COSTA, L.;BERNARDO, F. *et. al.* Influence of Puerperal Uterine Infection on Uterine Involutin and Postpartum Ovarian Activity in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.37, p.31-35,2002.

MAZUZ, M. L.;FISH, L.;REZNIKOV, D. *et. al.* Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, v.205, p. 85-81,2014.

MCALLISTER, M. M.;DUBEY, J. P.;LINDSAY, D. S. *et. al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol*, v.28, p.1473-1478,1998.

MCDOUGALL, S.;HUSSEIN, H.;ABERDEIN, D. *et. al.* Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*, v.76, p.229-240,2011.

MCGOWAN, M. R.;KAFI, M.;KIRLAND, P. D. Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology*, v.59, p.1051-1066,2003.

MEAS, S.;USUI, T.;OHASHI, K. *et. al.* Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds *Veterinary Microbiology*, v.84, 275-282,2002.

MEISWINKEL, R.;BALDET, T.;DERKEN, R. *et. al.* The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe e the entomological perspective. *Preventive Veterinary Medicine*, v.87, p.55-63,2008.

MELLOR, P. S. Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology*, v.123, p.231-247,2000.

MELO, C. B.;LEITE, R. C.;LOBATO, Z. I. P. *et. al.* Infection by Neospora caninum associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.119, p.97-105,2004.

MELO, C. B.;OLIVEIRA, A. M.;AZEVEDO, E. O. *et. al.* Antibodies to bluetongue virus in bovines of Paraíba State, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.1, 2000.

MELO, C. B.;OLIVEIRA, A. M.;CASTRO, R. *et. al.* Precipitating antibodies against the bluetongue virus in bovines from Sergipe, Brazil. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.2, n.2, p.125-127,1999.

MELTZER, A. E.;MATILE, H.;GASSMANN, U. *et. al.* European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol*, v.85, p.57-69,1985.

MELTZER, A. E. S., A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and anti-genic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurologic disease. *Archives of Virology*, v.87, p.205-217,1986.

MENDES, M. B.;BITTAR, J. F. F.;PEREIRA, W. A. B. *et. al.* Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG.In: ANAIS DO VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2009, Belo Horizonte. *Ciência Animal Brasileira*.p.772-777

MENDOZA-IBARRA, J. A.;PEDRAZA-DÍAZ, S.;GARCÍA-PEÑA, F. J. *et. al.* High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. *The Veterinary Journal*, v.193, p.146-151,2012.

MEYLING, A.;HOUE, H.;JENSEN, A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique*, v.9, p.75-93,1990.

MIDLEJ, V.;VILELA, R.;DIAS, A. B. *et. al.* Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Veterinary Parasitology*, v.165, p.216-230,2009.

MILLER, J. M.;MILLER, L. D.; OLSON,C. *et. al.* Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*, v.43, p.1297-1305,1960.

MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, v.45, n.4, p. 790-794,1984.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M.J. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.223-228,1986.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M.J. Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *American Journal of Veterinary Research*, v.48, n.11, p.1555-1558,1987.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M.J. Sorologic detection of Bovine Leukemia Virus infection. *Veterinary Microbiology*, v.31, 55,1976.

MINEIRO, A. L. B. B.;BEZERRA, E. E. A.;VASCONCELLOS, S. A. *et. al.* Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.5, p.1103-1109,2007.

MINEO, T. W. P.;ALENIUS, S.;NÄSLUND, K. *et. al.* Distribution of antibodies against Neospora caninum, BVDV and BHV-1 among cows in brazilian dairy herds with reproductive disorders. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v.15, n.4, p.188-192,2006.

MIYASAKA, T.;OGUMA, K.;SENTSUI, H. Distribution and characteristics of bovine leukemia virus integration sites in the host genome at three different clinical stages of infection. *Archives of Virology*, September, 2014.

MORAIS, M. H. F. Isolamento de Leptospira hardjo em rebanho bovino com problemas de reprodução. 1994. 47p. (Dissertação - Mestrado em Medicina Veterinária). - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOREIRA, E. C.;SILVA, J. A.;VIANA, F. C. Teste de imunodifusão para lingua azul em bovinos de alguns municípios do Brasil In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 1980, Belo Horizonte. Núcleo de Acessoramento à Pesquisa, 83p.

MOUSING, J.;CHRISTENSEN, J.;HAUGEGAARD, J. *et. al.* A seroepidemiological survey of Leptospira Bratislava infections in Danish sow herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v.23, p.201-213,1995.

MSHELIA, G. D., AMIN, J.D., WALDEHIWET, Z. Bovine venereal campylobacteriosis: an overview. *Perspect Agr Vet Sci Nutr Nat Resour*, v.14, n.2, 2007.

MUÑOZ-ZANZI, C. A.;THURMOND, M. C.;HIEATALA, S. K. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology*, v.61, p.1085-1099,2004.

MURRAY, G. L.;LO, M.;BULACH, M. *et. al.* Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo* for protection against kidney colonization. *Vaccine*, v.31, p.495-499,2013.

MURTAUGH, M. P.;LIN, G. F.;HAGGARD, D. L. *et. al.* Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, v.33, p.73-85,1991.

MURTY, G. V. K., NANJIAH, R.D., MURTHY, B.S.K. Bacterial flora of cervical mucus in repeat breeding bovines. *Indian Veterinary Journal*, v.51, p.264-268,1974.

MUSSO, D.;SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v.46, p.245-252,2013.

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

NANDI, S.;KUMAR, M.;MANOHAR, M. *et. al.* Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*, v.10, n.1, p.85-98,2009.

NASCIMENTO, M. G. F.;D'ANGELIS, F. H. F.;NASCIMENTO, E. R. *et. al.* Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.195-199,2005.

NICOLINO, R. R. Prevalência de anticorpos anti- Neospora caninum e aglutininas anti-Leptospira em rebanhos leiteiros na microrregião de Sete Lagoas - Minas Gerais, 2009/2010. 2011. 35p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

NUSINOVICI, S.;SEEGERS, H.;JOLY, A. *et. al.* Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds. *Theriogenology*, v.78, p.1140-1151,2012a.

NUSINOVICI, S.;SEEGERS, H.;JOLY, A. *et. al.* Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v.95, p.3008-3020,2012b.

OHSHIMA, K.;MORIMOTO, N.;KAGAWA, Y. A survey for Maternal Antibodies to Bovine Leukemia Virus (BLV) in Calves Born to Cows Infected with BLV. *The Japanase Journal of Veterinary Science*, v. 46, n.4, p.583-586,1984.

OHSHIMA, K.;TAKAHASHI, K.;OKADA, K. *et. al.* A pathological study on fetuses and placentas from cows affected with Enzootic Bovine Leukosis with reference to transplacental infection of Bovine Leukemia Virus. *The Japanase Journal of Veterinary Science*, v.44, p.479-482,1982.

OIE.Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.2010. Disponível em: <<http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>>.07 out. 2014.

DE OLIVEIRA, T. F. P. Padronização e aplicação da PCR para detecção de contaminantes em cultivos celulares, soros e tripsinas. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal).- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OROZCO, M. A.;MORALES, E.;SALMERÓN, F. Characterization of the Inflammatory Response in the Uteri of Cows Infected Naturally by *Neospora caninum*. *Journal Comparative Pathology*, v.148, p.148-156,2013.

OTT, S. L.;JOHNSON, R.;WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, v.61, p.249-262,2003.

PARSONSON, I. M.;CLARK, B. L.;DUFTY, J. H. Early pathogenesis and pathology of Tritrichomonas foetus infection in virgin heifers. *Journal of Comparative Pathology*, v.86, p.59-66,1976.

PEARSON, J. E.;JOCHIM, M. M. Protocol of the immunodiffusion test for bluetongue. In: Annual Proceedings. 22. ed. A. a. V. Diagnosticans, 1979. p. 463-471.

PEDRERA, M.;GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.;MOLINA, V. *et. al.* Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.59, p.377-388,2011.

PELLEGRIN, A. O. Campilobacteriose Genital Bovina na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Sul-Matogrossense e proposição de novas técnicas de diagnóstico. 2001. 74p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PELLEGRIN, A. O; LEITE, R.C. Atualização sobre tricomonose genital bovina. Embrapa Documentos, v.53, 2003.

PELZER, K. D. Economics of Bovine Leukemia Virus Infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.13, n.1, p.129-147,1997.

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

PIVETTA, C. G. Efeito da Leptospirose sobre a reprodução e a produção em rebanhos leiteiros e estimativa da herdabilidade. 2009. 58p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria

POLLARI, F. L.;WANGSUPHACHART, V. L.;DIGIACOMO, R. F. *et. al.* Effects of Bovine Leukemia virus infection on Production and Reproduction in Dairy Cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.56, p. 289-295,1992.

PRUNNER, I.;PORTHMANN, H.;WAGENER, K. *et. al.* Dynamics of bacteriological and citological changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.82, p. 1316-1322,2014a.

PRUNNER, I.;WAGENER, K.;PORTHMANN, H. *et. al.* Risks factors for uterine diseases on small- and medium- sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology*, v.82, p. 857-865,2014b.

RAAPERI, K.;BOUGEARD, S.;ALEKSEJEV, A. *et. al.* Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.54, n.4, p.1-10,2012.

RAE, D. O.;CREWS, J. E. *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.22, p.595-611,2006.

- RAGOZO, A. M. A.;PAULA, V. S. O.;SOUZA, S. L. P. *et. al.* Ocorrência de Anticorpos ANTI-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.12, n.1, p.33-37,2003.
- RAJÃO, D. S.;HEINEMANN, M. B.;LEITE, R. C. *et. al.* Leucose Enzoótica Bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v.64, p.60-72,2012.
- RAJÃO, D. S.;HEINEMANN, M. B.;REIS, J. K. P. *et. al.* Effects of bovine leukemia virus infection on crossbred and purebred dairy cattle productive performance in Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.35, n.2 (mar/abr), 891-900,2014.
- REGIDOR-CERRILLO, J.;ARRANZ-SOLÍS, D.;BENAVIDES, J. *et. al.* *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Veterinary Research*, v.45, n.10, p.1-15,2014.
- REINACHER, M.;THURMOND, M. C.;ONUMA, M. *et. al.* Immunohistological demonstration of Virus and Tumor associated antigens in tissues in Experimental and Spontaneous Bovine Leukemia Virus (BLV) Infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.22, p.223-231,1989.
- RHYANM, J. C.;BLANCHARD, P. C.;KVASNICKA, W. G. *et. al.* Tissue invasive *Tritrichomonas foetus* in four aborted bovine fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, p.409-412,1995.
- RIDPATH, J. F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, p.17-30,2005.
- RIZOS, D.;WARD, F.; DUFFY, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v.61, p.234-248,2002.
- ROBERT, A.;BEAUDEAU, F.;SEEGERS, H. *et. al.* Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology*, v.61, p.117-127,2004.
- ROBERTS, D. H.;LUCAS, M. H.;WIBBERLEY, G. *et. al.* An investigatious into the suscebility of cattle to bovine leukosis virus following inoculation by variou routes. *The Veterinary Record*, v.6, p.222-224,1982.
- ROBINSON, R. S.;HAMMOND, A. J.;WATHES, D. C. Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, n.2, p.104-112,2008.
- ROCHA, F. S.;JESUS, V. L. T.;TORRES, H. M. *et. al.* *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus* investigation in prepuical mucous of bulls from Médio Paraíba/RJ region, Brazil. *Ciência Rural*, v.39, n.5, 2009.
- ROCHA, M. A.;GOUVEIA, A. M. G.;LOBATO, Z. I. P. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.6, p.645-747,2001.
- RODGER, S. M.;MURRAY, J.; UNDERWOOD, C. *et. al.* Microscopical Lesions and Antigen Distribution in Bovine Fetal Tissues and Placentae Following Experimental Infection with Bovine Herpesvirus-1 during Pregnancy. *Journal Comparative Pathology*, v.137, p.94-101,2007.
- RODNING, S. P.;GIVENS, M. D.;MARLEY, M. S. D. *et. al.* Reproductive and economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus into a naive group of heifers. *Theriogenology*, v.78, p.1508-1516,2012.
- RÜFENACHT, J.;SCHALLER, P.;AUDIGE, L. *et. al.* The effect of infection with Bovine Viral Diarrhea Virus on the Fertility of Swiss Dairy Cattle *Theriogenology*, v.56, p.199-210,2001.
- SAEGERMAN, C.;BOLKAERTS, B.;BARICALLA, C. *et. al.* The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. *The Veterinary Journal*, v.187, p.72-80,2011.
- SAMARA, S. I.;DIAS, F. C.;MOREIRA, F. C. G. Occurence of the bovine viral diarrhoea in the south region of the state of Minas Gerais and northeast region of the state of São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, P.396-403,2004.
- SANHUEZA, J. M.;HEUERA, C.;WEST, D. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*, v.112, p. 90-98,2013.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; HAGE, J. J.; VANRIJN, P. A. *et. al.* Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology*, v.74, p.1377-1384,2010.

SANTOLARIA, P.; LÓPEZ-GATIUS, F.; YÁNIS, J. *et. al.* Early postabortion recovery of *Neospora*-infected lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.72, p.798-802,2009.

SANTOS, R. R. D.; GUIMARAES, A. M.; ROCHA, C. M. B. B. *et. al.* Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bezerras e novilhas de rebanhos leiteiros na microrregião de Lavras, Minas Gerais. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.1, p.271-280,2009.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; WILTBANK, M. C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, p.151-158,2010.

SCHURIG, G. D., HALL, C.E., BURDA, K. Infection patterns in heifers following cervicovaginal or intrauterine instillation of *Campylobacter (Vibrio) fetus venerealis*. *Cornell Veterinarian*, v.64, n.4, p.533-548,1974.

SEONG, G.; OEM, J. K.; LEE, K. H. *et. al.* Experimental infection of mice with bovine viral diarrhoea virus. *Arch Virol*, v.160, n.6, p.1565-1571,2015.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K. *et. al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. *Veterinary Parasitology*, v. 135, p. 197-203,2006.

SHAW, A.E.; MONAGHAN, P.; ALPAR, H.O. *et. al.* Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *Journal of Virological Methods*, v.145, p.115-126,2007.

SHELDON, I. M., DOBSON, H. Postpartum uterine recovery and its influence on ovarian activity – a preliminary report. *Cattle Practice*, v.7, p.409-410,1999.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G.; LEBLANC, S. *et. al.* Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.1516-1530, 2006.

SHELDON, M., RYCROFT, A.N., DOAN, B. Specific Strains of *Escherichia coli* Are Pathogenic for the Endometrium of Cattle and Cause Pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice. *Plos One*, v.5, n.2, e9192,2010.

SILVA, A. F.; RANGELA, L.; ORTIZA, C. G. *et. al.* Increased incidence of DNA amplification in follicular than in uterine and blood samples indicates possible tropism of *Neospora caninum* to the ovarian follicle. *Veterinary Parasitology*, v. 188, p.175-178,2012.

SILVA, R. C.; FONTANA, I.; MEIRELLES, F. C. *et. al.* Ocorrência de Leucose Enzoótica Bovina na forma de linfossarcomas no Distrito Federal: Relato de caso. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.5 (out/dez), p.507-512,2008.

SINGH, J.; SIDHU, S. S.; DHALIWAL, G. S. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Animal Reproduction Science*, v.59, p.156-166,2000.

SKIRROW, S.; BONDURANT, R. H. Bovine Trichomoniasis. *The Veterinary Bulletin*, v.58, p.591-603,1988.

SMYTH, J. A.; FITZPATRICK, D. A.; ELLIS, W. A. Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. *The Veterinary Record*, v.6, p.539-542,1999.

SPIPKI, F. R. E., P.A.; LIMA, M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, p.43-49,2004.

STAHL, K.; BJÖRKMAN, C.; EMANUELSON, U. *et. al.* A prospective study of the effect of *Neospora caninum* and BVDV infections on bovine abortions in a dairy herd in Arequipa, Peru. *Preventive Veterinary Medicine*, v.75, p.177-188,2006.

STOESSEL, F. *Las enfermedades venereas: Trichomoniasis y vibriosis genital*. Zaragoza: 1982.

STYNEN, A. P. R., PELLEGRIN, A.O., FÓSCOLO, C.B. Bovine genital campylobacteriosis in dairy herds with reproductive problems. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.6, p.766-769,2003.

TAEKYUN, S.; ACLAND, H. Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Science*, v.2, n.2, p.81-84,2001.

TEIXEIRA, W. C.; UZÊDA, R. S.; GONDIM, L. F. P. *et. al.* Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v..30, n.9, p.729-734,2009.

THURMOND, M. C.; CARTER, R. L.; PUHR, D. M. *et. al.* An epidemiological study of Natural in utero infection with Bovine Leukemia Virus. *The Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.47, p.316-319,1983.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v.58, n.12, p.1381-1385,1997.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R. *et. al.* Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum on cullin in dairy cattles in four Canadian provinces. *Veterinary Microbiology*, v.109, p.147-158,2005.

TRUYERS, I., LUKE, T., WILSON, D. Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. *BMC Veterinary Research*, v.10:280, 2014.

UHAA, I. J.; RIEMAN, H. P.; THURMOND, M. C. A cross-sectional study of bluetongue virus and Mycoplasma bovis infections in dairy cattle: II. The association between a positive antibody response and reproduction performance. *Veterinary Research Communications*, v.14, p.471-480,1990.

VALLE, P. S.; MARTIN, S. W.; SKJERVE, E. Time to first calving and calving interval in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) sero-converted dairy herds in Norway. *Preventive Veterinary Medicine*, v.51, p. 17-36,2001.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; SCHMERR, M. J. F. Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, v.42, p.1498-1500,1981a.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; SCHMERR, M. J. F. In utero transmission of Bovine Leukemia Virus. *American Journal of Veterinary Research*, v.42, n.6, p.1052-1054,1981b.

VANLEEUEWEN, J. A.; HADDAD, J. P.; DOHOO, L. R. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v.94, p.54-64,2010.

VARGAS, A. C., COSTA, M.M., VAINSTEIN, M.H. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.93, p.121-132,2003.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M. Consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, p.31-35,2005.

VILLARROEL, A.; CARPENTER, T. E.; BONDURANT, R. H. Development of a simulation model to evaluate the effect of vaccination against *Tritrichomonas foetus* on reproductive efficiency in beef herds. *American Journal of Veterinary Research*, v.65, p.770-775,2004.

WALDNER, C., HENDRICK, S., CHABAN, B. Application of a new diagnostic approach to a bovine genital campylobacteriosis outbreak in a Saskatchewan beef herd. *CJV*, v.54, April, p.373-376,2013.

WALDNER, C. L. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds *Animal Reproduction Science*, v.90, p.219-242,2005.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.123, p.127-138,2011.

WERNER, A., SUTHAR, V., PLÖNTZE, J, ET. AL. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *Journal of Dairy Science*, v.95, p.7105-7114,2012.

WILLIAMS, D. J.; HARTLEY, C. S.; BJORKMAN, C *et. al.* Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology*, v.136, p.1895-1900,2009.

WILLIAMS, E. J.; FISHER, D. P.; PFEIFFER, D. U. *et. al.* Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle *Theriogenology*, v.63, p.102-117,2005.

WILLIAMS, E. J., FISHER, D.P., NOAKES, D.E. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.68, p.549-559,2007.

YAGUIU, A.; DAGLI, M. L. Z.; BIRGEL JR., E. H. *ET AL.* . Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis *Genetics and Molecular Research*, v.7, n.2, p.497-487,2008.

- YULE, A.;SKIRROW, S. Z.;BONDURANT, R. H. Bovine trichomoniasis. *Parasitology Today*, v.5, p.373-377,1989.
- ZANELLA, G.;DURAND, B.;SELLAL, E. *et. al.* Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008–2009. *Theriogenology*, v.77, p.165-172,2012.
- ZERBE, H., OBADIK, C., LEIBOLD, W. Influence of *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils *Veterinary Microbiology*, v.79, p. 351- 365,2001.
- ZIECH, R. E., MACHADO, G., KIRINUS, J.K. *Campylobacter fetus* in cattle from Rio Grande do Sul state, Brazil. *Ciência Rural*, v.44, n.1, p.141-146,2014.
- ZIENTARA, S.;SAILLEAU, C.;VIAROUGE, C. *et. al.* Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg Infect Dis*, v.20, p.2123-2132,2014.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO I: Certificado do projeto na Comissão de ética no uso de animais – UFMG.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 68 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Pesquisa de agentes infecciosos em amostras de biópsia uterina de vacas leiteiras com problemas reprodutivos”, que tem como responsável Rômulo Cerqueira Leite, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 25/03/2014. Este certificado espira-se em 25/03/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 68 / 2014, related to the Project entitled “Research for infectious agents in uterine biopsy samples of dairy cows with reproductive problems”, under the supervision of Rômulo Cerqueira Leite, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 25/03/2014. This certificates expires in 25/03/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 25/03/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.2 ANEXO II – INFORMAÇÕES SOBRE OS INICIADORES UTILIZADOS

Agentes	Iniciadores	Sequência de iniciadores (5' – 3')	Tamanho molecular	Região do genoma	CT de corte	Nº ACESSO	Referência
GAPDH	709F 709R	GGTGTGCTGGTGTGCTGAGTA CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT	709pb	GAPDH	-	ND	(OLIVEIRA, 2012)
Beta Actina	ACTIN-Taq-F ACTIN-Taq-R ACTIN-Taq	AACCAGTTCGCCATGGAT TGCCGGAGCCGTTGT 6-FAM/TGATATTGCTGCGCTC GTGGTC/3BHQ_1	58pb	Bos taurus beta-actin Bos taurus beta-actin Bos taurus beta-actin	ND	AY-141970	(BIELANSKI <i>et al.</i> , 2009)
BoHV-1	F R S	TGTGGACCTAAACCTCACGGT GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC 6FAM/AGGACCGCGAGTTCTTGCCGC /BHQ_1	97pb	<i>ul27</i> (codificante de gB)	40	KM258883.1	LBM – LANAGRO (MG)
<i>Trichomonas</i>	F R S	GGCAATGGATGTCTTGGCTTC GCGCAATGTGCATTCAAAGA 6FAM/CGTTGCATAATGCGATAAGCGGCTGG/BHQ_1	108pb	95-202 small subunit ribosomal RNA gene	40	JX960422.1	LBM – LANAGRO (MG)
<i>Leptospira</i>	F R S	AAGCATTACCGCTTGTGGTG GAACTCCCATTTTCAGCGATT 6FAM/AAAGCCAGGACAAGCGCCG/BHQ_1	242pb	1741111 - 1740870 <i>LipL32</i>	42	CP006723.1	LBM – LANAGRO (MG)
<i>Campylobacter</i>	F R	GCGGTGGAGCATGTGGTTTA CTCACGACACGAGCTGACGA	147pb	697668 - 697814 16S ribosomal RNA	38	CP010906.1	LBM – LANAGRO (MG)
<i>E. coli</i>	F R	GTTAATACCTTTGCTC ATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	340pb	16S ribosomal RNA	-	ND	(Malinen <i>et al.</i> , 2003)

Agentes	Iniciadores	Sequência de iniciadores (5' – 3')	Tamanho molecular	Região do genoma	CT de corte	Nº ACESSO	Referência
<i>Neospora caninum</i>	NC550 NC596 NCprobe	GGGTGAACCGAGGGAGTTG ACGTGAGGAATGACTAACCACAA 6FAM/AGCGGTGAGAGGTGGGATACGTGG/BH1	142pb	Região NC5	42	X84238	(Ghalmi <i>et al.</i> , 2008)
BTV	BTVrsa 291–311F BTVrsa 387-357R BTVuni 291-311F BTVuni 381-357R Sonda RSA Sonda 323	GCGTTCGAAGTTTACATCAAT CAGTCATCTCTCTAGACACTCTATAATTACG GCTTTTGAGGTGTACGTGAAC TCTCCCTTGAAACTCTATAATTAC CGGATCAAGTTCACTCCACGGT TCTCCGGATCAAGTTCACTCCA	97pb	Segmento 1	35	AY154458	(Shawa <i>et al.</i> , 2007)
BVDV	Pesti-F Pesti-R BVDV1	CTAGCCATGCCCTTAGTAG CGTCGAACCAAGTGACGACT FAM-TAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGG CT-BHQ-3	ND	5'-UTR	37	ND	(Maxi <i>et al.</i> , 2006)
BLV	1ª	CTTTGTGTGCCAAGTCTCCAGATACA	440	ENV	-	K02120	(OIE, 2010)
	6ª	CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC					
	3ª	CTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGC	341				
	5ª	GACAGAGGGAACCCAGTCACTGTTCAACTG					

ND: Não descrito na fonte consultada