

LUIZ FELIPE CARON

**INTERCORRÊNCIA ENTRE DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV),
RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR/IPV) E
LEPTOSPIROSE DOS BOVINOS EM VACAS
LEITEIRAS DESCARTADAS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:
Prof. Yasuyoshi Hayashi

CURITIBA
2001



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **LUIZ FELIPE CARON** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada “**Intercorrência entre Diarréia Viral Bovina, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Leptospirose dos Bovinos em Vacas Leiteiras Descartadas**” foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o conceito “B” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 15 de janeiro de 2002.



Prof. YASUYOSHI HAYASHI
Presidente/Orientador



Prof. Dr. JOÃO CAETANO FORTES
Membro



Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO GHIGNATTI WARTH
Membro

DEDICATÓRIA

À minha esposa Rose, e aos meus filhos
Gabriel e Lucas, por estarem sempre
presentes me confortando em todos os
momentos !!!

Aos meus pais, Osni e Dóris, por me
permitirem chegar onde estou !!

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao professor Hayashi, por despertar em mim o senso de competência e moral, do quais não haveria melhor exemplo, além é claro da orientação, respeito e amizade.

Especialmente também ao meu irmão Paulo Eduardo, pelo apoio profissional e pessoal no dia-dia, onde certamente crescemos mutuamente.

À Nutrisul, em especial ao Gerson e o Gilmar, os quais considero meus irmãos, pela oportunidade e confiança depositada.

Ao Abatedouro de Bovinos Lagoa Grande e seu proprietário Rogerio Melo, pelo apoio e fornecimento do material utilizado neste trabalho.

Ao Lacen, em especial à Dra. Irene Skraba, pela realização dos exames de leptospirose.

Ao laboratório Marcos Enrietti e o Sr. Rinus Bloonrad, pelo acompanhamento das provas de BVDV.

Ao laboratório *Fort Dodge* pelo financiamento das provas de IBR e BVDV.

À Universidade Federal do Paraná, especialmente à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade para a realização do Mestrado.

A todos os proprietários de bovinos leiteiros que enviaram animais ao abatedouro, pela cooperação.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	iv
Lista de gráficos	v
Lista de fotos/figuras	vi
Resumo	vii
<i>Abstract</i>	viii
Introdução.....	01
Justificativa	05
Revisão de literatura	09
Diarréia Viral Bovina	09
Rinotraqueíte Infecciosa Bovina	13
Leptospiros.....	18
Material e métodos	21
Resultados	27
Discussão	34
Conclusões	39
Referências bibliográficas	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição da frequência de amostras de soro bovino, positivas e negativas para anticorpos anti HVB-1, identificadas pelo teste de ELISA.	17
TABELA 2 – Sorovares de leptospirose utilizados na soroaglutinação microscópica.	25

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Prevalência da Diarréia Viral Bovina em vacas leiteiras descartadas.....	27
GRÁFICO 2 – Prevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em vacas leiteiras descartadas.....	28
GRÁFICO 3 – Prevalência da Leptospirose em vacas leiteiras descartadas.....	29
GRÁFICO 4 – Frequência de sorovares de leptospirose em vacas leiteiras descartadas	30
GRÁFICO 5 – Prevalência sorológica de duas ou mais doenças associadas.....	31
GRÁFICO 6 – Porcentagem de animais positivos para as três doenças.....	31
GRÁFICO 7 –Porcentagem de animais negativos para as três doenças	32
GRÁFICO 8 –Porcentagem de animais positivos apenas para BVDV.....	32
GRÁFICO 9 –Porcentagem de animais positivos apenas para IBR/IPV	33
GRÁFICO 10 –Porcentagem de animais positivos apenas para Leptospirose.....	33

LISTA DE FOTOS/FIGURAS

Foto 1 - Fêmea bovina leiteira descartada.....	04
Figura 1 – Efeitos das cepas citopática e não citopática do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no desenvolvimento do bezerro fetal	11

RESUMO

Foram avaliadas 431 amostras de soro bovino, coletadas em abatedouro, entre os meses de março e setembro de 2000, provenientes de vacas leiteiras descartadas oriundas das bacias leiteiras de Castro, Arapoti, Carambeí e Lapa – PR. Objetivou-se estabelecer as prevalências de três doenças associadas a transtornos reprodutivos em bovinos, que seriam a Diarréia Viral Bovina (BVDV), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Leptospirose. Tais doenças são relatadas com frequência em vários estudos tanto no Brasil como no resto do mundo, no entanto carecem de dados consistentes que indiquem estratégias eficazes de controle. As amostras foram testadas para BVDV através da técnica de anticorpos monoclonais, para IBR pela soroneutralização e para leptospirose pela técnica de soroaglutinação microscópica. Analisando-se os resultados verificou-se que as prevalências para BVDV, IBR e leptospirose foram respectivamente de 67.5%, 51% e 32.5%. O número de animais que apresentaram reações positivas para apenas uma doença foi de 80 para BVDV, 28 para IBR e 18 para leptospirose. Encontrou-se 24,1% dos animais positivos para BVDV e IBR simultaneamente, 7,6% foram positivos para BVDV e leptospirose e 4% dos animais apresentaram-se positivos para IBR e leptospirose. A maior prevalência de outras doenças associadas a BVDV, denota o potencial imunossupressor desta doença, justificando um dos fatores que gera a múltipla etiologia de doenças envolvidas nas síndromes reprodutivas. Para a leptospirose encontrou-se com uma alta frequência (19%) a presença de sorovares que não são utilizados na formulação de vacinas, indicando a necessidade de novas formulações. 18,8% dos animais testados apresentaram-se negativos para as três doenças em questão e 16,2% dos animais positivos para as três doenças.

ABSTRACT

A valuation of 431 samples of bovine serum were collected in a butchery between the months of march and september, 2000, coming from eliminated dairy cattle native from Castro, Arapoti, Carambei and Lapa city, all cities from Paraná State. The objective was to establish the prevailing of 3 illness associated to reproduction problem in bovines, as Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), , Infections Bovine Rhinotracheitis (IBR) and Leptospirosis. Those illness are related frequently in many studies in Brazil as abroad, although, there is a need of solid facts to indicate effective strategies of control. The samples were tested for BVDV through monoclonal antibodies techniques, for IBR by virus neutralization and for leptospirosis by microscopic agglutination technique. The results analyzed should that the prevail for BVDV, IBR and leptospirosis were respectively 67,5%, 51% and 32,5%. The number of animals which presented positive reactions for only one illness were 80 for BVDV; 28 for IBR and 18 for leptospirosis. Were realized that 24,1% of the animals were positive for BVDV and IBR simultaneously; 7,6% were positive for BVDV and leptospirosis and 4% of the animals presented positive for IBR and leptospirosis. The most prevail of other illness associated to BVDV shows the potential immunosuppressive of this illness justifying one of the factors generated of multiple-etiology of associated illness of reproduction problem. For leptospirosis found a high frequency (19%) to sorovars presented which are not used for the formulation of vaccines, indicating the necessity of a new formulation. 18,8% of the tested animals presented negative for the three illness in question and 16,2% of the animals were positive for the three illnesses.

1. INTRODUÇÃO

A exploração comercial de bovinos no Brasil, destinados à produção de carne e leite principalmente, remonta há séculos. Mesmo com o incremento e tecnificação na produção de carne e leite por outras espécies animais, como alternativas aos produtos bovinos, estes continuam tendo a preferência do mercado nacional, especialmente no que se refere à produção de leite.

Sendo assim, os bovinos sofreram ao longo dos anos uma intensa seleção genética, a fim de que animais com alto valor genético, produzindo leite a baixo custo em nossa realidade, fossem cada vez mais disseminados, otimizando a produção leiteira. Paralela a esta evolução, surgiram pontos que aumentaram a fragilidade do processo, exigindo que houvessem maiores investimentos em nutrição animal de qualidade, investimentos em instalações adequadas para promover o bem estar dos animais e incrementos maciços em controles sanitários, adequados a um sistema de produção intensivo.

Se em algum momento, qualquer um destes pontos for relegado, certamente o potencial produtivo dos animais será prejudicado, gerando prejuízos que muitas vezes fogem do controle, culminando com a triste realidade encontrada hoje na produção leiteira, quando o abandono da atividade é mais vantajoso que a permanência no processo.

Com todos os esforços dispensados neste sentido, ainda existem muitos fatores que determinam a queda na produção leiteira direta ou indiretamente, e que carecem de controle adequado. Tal afirmação pode ser comprovada pela verificação diária de vacas leiteiras nos abatedouros inspecionados, oriundas de fazendas especializadas, dedicadas ao melhor sistema de exploração leiteira.

Tal constatação é um paradoxo, pois todos estes animais foram selecionados para otimizar a produção de leite, mas por vários motivos chega-se um momento em que o descarte prematuro dos animais é mais viável economicamente do que a permanência e o tratamento dos mesmos na

propriedade. Este descarte é ocasionado por uma conjunção de fatores que culminam com a inviabilidade na manutenção dos animais na propriedade. A justificativa para o fato é de que em algum momento aqueles investimentos citados anteriormente falharam, impedindo não só a melhora do potencial individual, mas de toda a exploração como um todo. Dentre os vários fatores que levam ao descarte, muitos podem, de uma maneira geral, ser verificados por inquéritos nas propriedades e pela verificação das condições do animal nos abatedouros. Dentro desta perspectiva, percebe-se que muitos animais são eliminados por problemas relacionados à produção leiteira propriamente dita, ou seja, na glândula mamária. Estas situações estão atreladas muitas vezes a deficiências no manejo higiênico da ordenha ou mesmo a doenças intercorrentes. Outros animais são eliminados devido a transtornos ocasionados por carências nutricionais, provenientes da falta de orientação especializada e mesmo devido a impossibilidade financeira. Mas na grande maioria das situações estes animais são descartados devido a deficiências reprodutivas, o que pode ser constatado pela frequência de animais nos abatedouros com históricos de abortos, repetições de cio, reabsorções fetais e vários outros transtornos que geram uma baixa fertilidade.

As várias causas, inclusive aquelas relacionadas a processos infecciosos zoonóticos que ocasionam as falhas reprodutivas, dificultam de certa maneira a determinação precisa da causa do problema, fazendo com que as estratégias de controle presentes na atualidade sejam, para muitas doenças, confusas, impossibilitando uma ação eficaz para minimizar estas perdas reprodutivas.

Neste contexto, o presente estudo procurou estabelecer a incidência de três doenças associadas a problemas reprodutivos em bovinos, e que estão numa fase incipiente no que se refere ao controle, que são: **Diarréia Viral Bovina (BVDV), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) e Leptospirose.** Tais

doenças são relatadas, com freqüência, associadas aos transtornos reprodutivos em estudos realizados em todo o mundo.

No Brasil a leptospirose começou a ser diagnosticada por Aragão em 1917 (MANUAL DE LEPTOSPIROSE/MINISTÉRIO DA SAÚDE); Segundo dados de LEITE(1999), a IBR foi diagnosticada no Brasil em 1960 por GALVÃO *et al* , e a BVDV por CORREIA em 1968. Desde então muitos pesquisadores comprovaram a existência destas doenças nos rebanhos nacionais, tanto isoladamente como associadas muitas vezes, sem contudo calcular a importância econômica a elas atribuídas (LEITE, 1999) e principalmente sem propor uma estratégia de controle eficaz e viável.

Segundo MELO (1999), o processo de desestruturação progressiva de alguns serviços de sanidade animal tem interferido negativamente nas condições de saúde dos rebanhos bovinos de nosso país, afetando principalmente os pequenos produtores, os quais, por que não podem ou não sabem recorrer a mecanismos alternativos de atenção veterinária, freqüentemente submetem seus animais a um manejo geral falho, particularmente sob seus aspectos sanitários, o que propicia o convívio intenso e prolongado de bovinos doentes, fontes naturais e potenciais disseminadores de agentes infecciosos, expondo continuamente os animais sadios ao risco de infecções.

Todo este conjunto de situações justifica de certa maneira a alta freqüência de fêmeas bovinas leiteiras nos abatedouros, muitas vezes em suas épocas mais produtivas. Vários estudos encontrados na literatura brasileira e internacional, versam geralmente sobre inquéritos epidemiológicos de uma única doença e principalmente em animais em produção nas fazendas leiteiras ou de corte, mas raramente em animais descartados. Mesmo nestas condições, quando estudam-se algumas das doenças em questão, encontram-se prevalências altas. GUIMARÃES (2000), encontrou 55% de animais positivos para BVDV associados a problemas de pododermatite em bovinos no

estado de São Paulo; RIBEIRO (2000) cita uma taxa de prevalência de 39,5% para Leptospirose em rebanhos pesquisados em Minas Gerais.

LANGONI (1999), em São Paulo, encontrou 33,3% de animais positivos para BVDV e 41,9% de positividade para IBR, sendo que 17,8% dos animais foram positivos para as duas doenças. FREITAS *et al* (1998) pesquisando bovinos na bacia leiteira de Londrina – PR, encontrou 33,7% de animais positivos para Leptospirose e MADRUGA (1982) no Mato Grosso do Sul cita 74,3% de bovinos positivos para Leptospirose.

Diante do exposto, a realização deste estudo tem como objetivo avaliar aspectos epidemiológicos relacionados a prevalência sorológica das três doenças em questão em fêmeas bovinas leiteiras, descartadas, provenientes das principais bacias leiteiras da nossa região (Castro, Arapoti, Carambeí, Palmeira e Lapa, estado do Paraná), através de provas diagnósticas específicas, cujos resultados, pela natureza globalizada das informações, são relativamente escassos. Ao se revisar conceitos importantes sobre tais doenças e correlacioná-los a novos dados obtidos, pretende-se contribuir para o estabelecimento de medidas mais efetivas de combate, por meio de programas sanitários e alertar entidades oficiais e particulares, para a importância destas doenças, a fim de minimizar os prejuízos causados, que muitas vezes não são percebidos na cadeia produtiva (FOTO 1).



2. JUSTIFICATIVA

A pecuária leiteira nacional vem atravessando um momento de extrema turbulência, o qual é reflexo de políticas econômicas adotadas nas últimas décadas. Sob a ótica econômica, a atividade leiteira é uma importante geradora de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia.

O Brasil é o sexto maior produtor de leite mundial, e toda a cadeia produtiva do leite gera mais empregos do que a construção civil, a siderurgia e a indústria automobilística entre outros. Segundo pesquisa da Revista DBO Rural (fevereiro, 2000), a agroindústria leiteira dá ocupação direta a 1 milhão de pessoas na produção no campo, 42.000 no transporte do produto das fazendas aos postos de recepção e resfriamento. No processamento industrial oferece emprego igualmente direto a mais de 1 milhão de pessoas.

Segundo dados do CENSO AGROPECUÁRIO, 1995/1996, 4,8 milhões de pessoas dedicavam-se à pecuária. Estes dados não distinguem a pecuária leiteira da pecuária de corte, mas a atividade leiteira é, reconhecidamente, muito mais intensiva em mão de obra do que a pecuária de corte.

Neste panorama, é pertinente se imaginar que uma crise no setor leiteiro gera desequilíbrios sociais e econômicos de grande vulto. Sendo assim não se admitem prejuízos na cadeia produtiva, e a sanidade dos animais está diretamente relacionada ao fato, sendo consequência direta de investimentos e modernizações no manejo a fim de se acompanhar a evolução no setor.

Entretanto, nas décadas de 70 e 80, a pecuária leiteira, em termos de modernização, caminhou muito lentamente. Parte significativa deste contraste é explicada pelas políticas adotadas pelo governo para este setor. Durante 45 anos, entre 1946 e 1991, houve controle do governo sobre os preços praticados no leite tipo C, tanto para o produtor, quanto para o consumidor final, como uma das formas de controlar os índices inflacionários e assim, os reajustes salariais. Em períodos de entressafra, quando

freqüentemente ocorria escassez do produto, o governo adotava políticas de normalização do abastecimento interno e o não comprometimento da política de combate às elevações de preços dos produtos que compõe a cesta básica.

Essa interferência federal provocava freqüente defasagem entre custos e receitas do produtor que, conseqüentemente, não tinha capacidade ou interesse em investir em processos tecnológicos mais produtivos, gerando drásticas reduções na oferta.

Segundo REIS (1994), a política de preços do leite adotada no país, no final da década de 70 e durante toda a década de 80, fixou os preços internos inferiores aos praticados no mercado mundial. Tal situação levou a uma forte descapitalização do setor. Isto fez com que a cadeia não se mostrasse viável do ponto de vista econômico, a investimentos empresariais, o que prejudicou significativamente a atividade. Por outro lado, as condições que o mercado externo oferecia para a compra de leite eram muito atraentes, com prazo dilatado para pagamento e juros baixos.

Entretanto desde o início da década de 90, a produção leiteira nacional vem passando por profundas transformações, provenientes de alguns fatores, como a desregulamentação do mercado, com o fim do controle estatal sobre os preços; o processo de abertura comercial em relação ao mercado internacional, realizada no governo Collor; a consolidação do Mercosul; e a estabilização da economia a partir do Plano Real em 1994.

Esta combinação de maior abertura para o mercado internacional, da queda do tabelamento do preço e da estabilidade da economia do país contribui para aumentar consideravelmente a concorrência em toda a cadeia do setor leiteiro, do produtor ao consumidor. A consequência natural do aumento da concorrência é a queda das margens de ganho dos agentes econômicos envolvidos nesse processo, especialmente os produtores, em razão do menor poder de barganha.

Enquanto na década de 70 o crescimento da produção baseava-se na incorporação de novas áreas (crescimento horizontal), na década de 80

em diante, a produtividade se torna o fator primordial (crescimento vertical). Nesse período, 80% do crescimento da produção ocorreu em razão do crescimento extensivo, ou seja, da incorporação de novas vacas ordenhadas, e apenas 20% em razão do aumento da produtividade (GOMES, 1996).

Entretanto, a partir de meados dos anos 80 e início dos anos 90, a produtividade passou a ocupar posição de destaque nesta explicação. Apesar de ainda estar longe de ser comparada aos índices de países mais tecnificados nesta produção, a produtividade da pecuária leiteira, nos últimos anos, vem melhorando significativamente no Brasil.

A abertura comercial ocorrida no Brasil trouxe como consequência a necessidade de aumentos de produtividade e de melhoria da qualidade para tornar o produto brasileiro competitivo em relação ao de outros países, na medida em que o consumidor passou a ter acesso a produtos lácteos de todo o mundo.

Essas mudanças estruturais estão provocando um inevitável processo de seleção dos produtores, restando os mais eficientes, onde os pontos principais são redução de preços, com aumento da eficiência produtiva ao longo de toda a cadeia, assim como uma melhoria da qualidade dos produtos ofertados.

Um agravante entretanto na atualidade (novembro/2001) é que mesmo os produtores que sobreviveram a esta seleção acabam ficando à mercê de cartéis que manipulam a oferta e a procura do leite, praticando preços que não seguem qualquer parâmetro de mercado. Um exemplo desta dificuldade é observado agora, quando o produtor que vinha recebendo nos meses de agosto/setembro de 2001 R\$0.38 por litro de leite, viu o preço ser baixado à R\$0.19/ litro sem qualquer justificativa coerente que sustente tal fato, gerando um déficit na propriedade incompatível com a atividade.

Para o produtor que consegue ainda manter a atividade, baseada em investimentos em manejo, material genético e nutrição, a receita da produtividade diminui significativamente. No entanto, os compromissos

assumidos muitas vezes com financiamentos e compra de animais, precisam ser honrados.

Assim o primeiro ponto a ser relegado é a alimentação dos animais, quando se procuram alternativas viáveis economicamente. Esta conduta é freqüentemente observada porque o valor dos insumos utilizados continuam os mesmos, como milho e soja que são cotados em dólar, sendo o leite cotado pelo interesse particular dos grandes cartéis.

O grande problema é que as alternativas viáveis economicamente, não fornecem o mínimo necessário para a manutenção dos animais justamente quando as deficiências nutricionais começam a predispor os animais a doenças que comprometem a eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho.

Baseado nestes fatos, esta pesquisa justifica-se por procurar identificar pontos que prejudiquem a eficiência produtiva, mais especificamente problemas relacionados a sanidade dos animais. Se o exposto é verdade, a falta de investimentos sofrida pelo setor nas últimas décadas certamente irá refletir numa maior incidência de problemas relacionados às doenças pesquisadas, pois o próprio controle destas doenças carece de investimentos e de interesse por parte do produtor.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV)

A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina tem sido associada a uma grande variedade de manifestações clínicas que incluem desde infecções inaparentes até enfermidades fatais como a doença das mucosas (BAKER, 1995).

A Diarréia Viral Bovina é causada por um vírus que possui como ácido nucleico RNA de fita simples, com polaridade positiva, sendo um dos mais simples vírus envelopados de animais (BARBOSA, 1999). Juntamente com o vírus da peste suína clássica e da doença das fronteiras (*border diseases*), o vírus da Diarréia Viral Bovina pertence ao gênero *Pestivirus*, anteriormente classificado na família *Togaviridae*, foi reclassificado na família *Flaviviridae* em 1991, através das suas características e estratégias de expressão gênica (HEINZ-JÜRGEN, 1995).

O vírus da Diarréia Viral Bovina é um dos patógenos mais ubíquos em todo o mundo e é considerado o protótipo do gênero *Pestivirus* (BOLIN, 1993). Existem dois biotipos na natureza, as amostras citopáticas (CP) e as não citopáticas (NCP), divisão decorrente da característica de replicação destas amostras em culturas de células, induzindo ou não efeito citopático. Um fator importante na diferenciação destes dois biotipos reside na descoberta de uma proteína chamada P₈₀. Esta proteína está presente nas amostras não citopáticas como parte de uma proteína maior, a P₁₂₅. Esta última proteína nas amostras citopáticas é clivada em P₅₄ e P₈₀. A proteína P₈₀ é imunodominante, induzindo grande resposta imunológica em todos os animais infectados com amostras citopáticas. O papel da proteína P₈₀ no efeito citopático ainda não está bem esclarecido.

Além desta classificação, as amostras do vírus podem ainda ser divididas em Genótipo I e II, através do perfil de restrição enzimática do

genoma. Na natureza, a amostra não citopática é mais comum, causando infecções intrauterinas principalmente, representando aproximadamente 95% das amostras de campo (CORTESE *et al*, 1998). O Genótipo II é associado a quadros mais severos da doença, com uma morbidade de até 80% (BARBOSA, 1999).

Dentro do espectro de manifestações clínicas causadas pelo vírus da Diarréia Viral Bovina, faz-se importante, particularmente neste estudo, a compreensão da patogênese da infecção intrauterina, pois além de estar diretamente envolvida no descarte de alguns animais, tem importância no estabelecimento de estratégias de controle eficazes.

Vários estudos deixam bem documentado que o vírus da Diarréia Viral Bovina pode atravessar a barreira placentária e infectar o feto em todas as fases de gestação. A consequência desta infecção é totalmente dependente do estágio de gestação em que ela ocorre. Embriões parecem ser resistentes à infecção até a perda da zona pelúcida, que ocorre por volta dos dez dias de gestação. A susceptibilidade torna-se maior seguindo-se a implantação do embrião, que ocorre por volta dos vinte dias de gestação. Durante esta fase inicial de gestação, a infecção com o vírus frequentemente resulta em morte embrionária e reabsorção fetal. Se a infecção fetal ocorre durante o primeiro trimestre de gestação, poderá resultar em aborto ou mumificação fetal. Se o feto sobreviver a esta infecção, ou infectar-se mais tardiamente, até os 130 dias de gestação, ele invariavelmente tornar-se-á imunotolerante, ou persistentemente infectado (PI). Há a necessidade de que a amostra do vírus em questão seja não citopática, sendo que pequenas quantidades do vírus no sangue da mãe são suficientes para o desenvolvimento de crias imunotolerantes (BOLIN, 1993), (FIGURA 1).

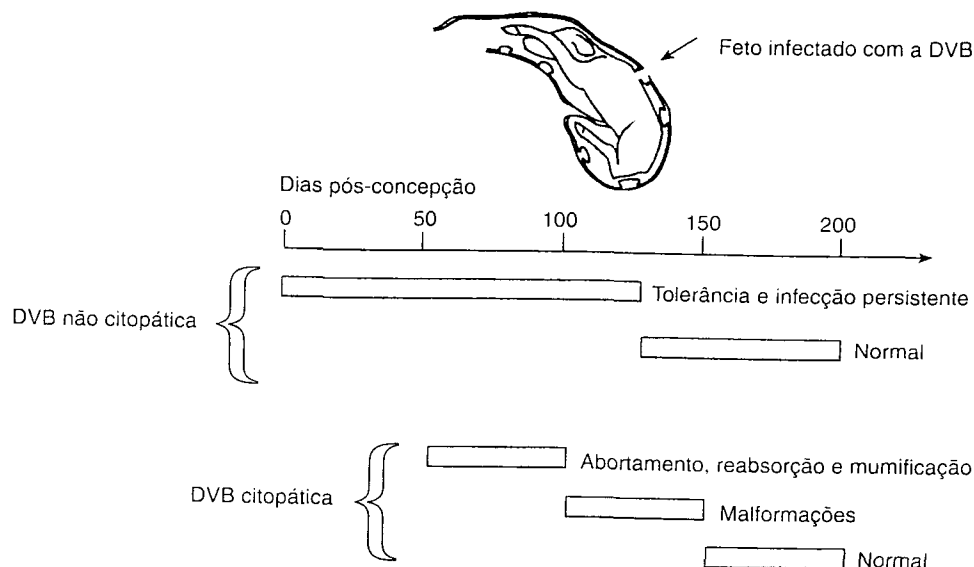


Figura 1- Efeitos das cepas citopática e não citopática do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no desenvolvimento do bezerro fetal.

Nesta fase de gestação descrita, o feto está iniciando seu processo de imunocompetência, reconhecendo os antígenos próprios, um processo necessário para se evitar autoimunidade. Se o vírus da Diarreia Viral Bovina está presente durante esta fase, ele também será reconhecido como próprio, o que permitirá a sobrevivência e replicação do vírus no feto e também após o nascimento. Os animais PI são a principal fonte de disseminação viral em um rebanho, apresentando-se muitas vezes com diarreia enquanto bezerros, estando também susceptíveis ao efeito imunossupressor do vírus, devido normalmente à liberação de prostaglandina pela célula infectada, o que tem um papel decisivo no estabelecimento de infecções oportunistas (BROCK, 1995). A infecção fetal durante o terceiro trimestre de gestação pode resultar no aparecimento de diferentes anomalias congênitas, as quais variam conforme a época mais específica da infecção.

Segundo MAYR *et al* (1981) a Diarreia Viral Bovina foi diagnosticada e identificada em 1946, por OLAFSON e WALKER, com a descrição de um quadro agudo de diarreia, altamente transmissível. Na década de 80 foi esclarecido que somente os animais PI desenvolviam esta forma da doença (OIRSCHOT, 1999), e hoje em dia devido à infecção pela Diarreia Viral Bovina estar amplamente distribuída no rebanho bovino brasileiro (FLORES, *et al*, 2000), a incidência da doença sob o aspecto reprodutivo revela maior

importância, devido aos prejuízos econômicos imputados às diferentes explorações.

Segundo HOUE (2001), várias investigações epidemiológicas realizadas nos Estados Unidos e diversos países da Europa revelam uma incidência que gira em torno de 60 a 80% de animais soropositivos para Diarréia Viral Bovina.

Segundo LEITE (1999), no Brasil a Diarréia Viral Bovina foi diagnosticada inicialmente por CORREIA em 1968, a partir daí vários levantamentos epidemiológicos têm denotado a presença disseminada desta infecção no rebanho bovino brasileiro.

CASTRO (1988), em Minas Gerais, pesquisando fêmeas bovinas em programas de transferência de embriões, detectou 37,3% de animais positivos para BVDV.

Estudo realizado por LANGONI *et al* (1999) em soros provenientes de diferentes regiões do interior de Estado de São Paulo, identificou 33,3% de amostras positivas para BVDV.

Estudos realizados no Rio Grande do Sul por CANAL *et al* (1998), com soros provenientes do próprio Estado e de algumas fazendas da região de Corrientes, Argentina, detectaram a presença de anticorpos para BVDV em 56% dos animais testados.

Prevalência semelhante foi encontrada por GUIMARÃES (2000), analisando animais com pododermatite no estado de Goiás.

Com a alta prevalência relatada para Diarréia Viral Bovina, em estudos nacionais e internacionais, é fácil perceber a importância de novos estudos que versem sobre o controle desta enfermidade de uma maneira eficaz, a fim de minimizar os prejuízos imputados à pecuária nacional.

3.2 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR/IPV)

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina é uma doença determinada por uma complexa síndrome que provoca vários quadros clínicos e perdas significativas na exploração pecuária (ALFIERI, 2001).

O agente etiológico da IBR/IPV é o Herpesvirus bovino tipo I (HVB-1), o qual afeta principalmente os sistemas respiratório e reprodutivo. Outras formas de apresentação da doença, como distúrbios no sistema nervoso central, estão associadas a um outro sorotipo, o HVB-5 (BABIUK, 1996).

A doença é provocada por um DNA vírus pertencente à família *Herpesviridae*, enquadrando-se no gênero *Alphaherpesvirus*. Esta virose está presente em plantéis bovinos de praticamente todo o mundo. A forma respiratória foi diagnosticada na década de 50 nos Estados Unidos, quando MILLER procedeu os primeiros isolamentos, caracterizando uma doença bastante contagiosa em animais de confinamento (ROCHA, 1999).

Logo verificou-se que após estes surtos da doença respiratória, havia a ocorrência de transtornos reprodutivos. Segundo LEITE (1999), no Brasil seu primeiro relato foi feito por GALVÃO *et al* (1960), na Bahia. O autor realizou um levantamento sorológico em animais adultos, que revelou 35% de positividade.

Apesar de representar apenas um sorotipo, o HVB-1 pode ser molecularmente subdividido em subtipos. Uma estreita correlação entre subtipo molecular e quadro clínico é de difícil estabelecimento, entretanto o subtipo HVB-1.1, compreende as amostras víricas implicadas em problemas respiratórios e reprodutivos. Os subtipos HVB-1.2a e HVB-1.2b estão relacionados às infecções genitais características, mas também podendo ser isolados do trato respiratório. Uma correlação possível de ser realizada refere-se aos subtipos HVB-1.3a e HVB-1.3b, atualmente reclassificados como HVB-5, que somente foram isolados, até o momento, a partir do sistema nervoso

central de bezerros e animais adultos com quadro clínico neurológico (ROEHE *et al*, 1999).

As apresentações clínicas da rinotraqueíte infecciosa bovina são muito variadas, ocasionando infecções no trato respiratório, caracterizada muitas vezes por corrimento nasal, formando crostras que quando removidas deixam a região das narinas avermelhadas (*red nose*). Concomitante à esta apresentação, evolui uma forma ocular, eventualmente com severa inflamação da conjuntiva. No entanto, a manifestação que acarreta os maiores prejuízos econômicos é a reprodutiva. O vírus pode causar infertilidade temporária em vacas e novilhas quando infectadas durante o estro ou início da gestação, sendo muitas vezes difícil de ser detectado.

A Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e a Balanopostite Infecciosa dos touros são também doenças genitais dos bovinos causadas pelo HVB-1. As lesões aparecem como pequenas pápulas avermelhadas na mucosa do prepúcio, pênis ou vagina, tornando-se edemaciada, hiperêmica e dolorida. Alguns machos podem apresentar aderências do prepúcio ao pênis e se tornarem incapacitados para a monta por algumas semanas.

Na forma genital do touros, o vírus se replica predominantemente na mucosa prepucial e na uretra, podendo contaminar o sêmen durante a ejaculação, quando passa sobre as mucosas contaminadas (ENGELBURG *et al*, 1995).

Tem sido demonstrado por vários autores que a monta natural por touros que apresentam o sêmen contaminado pelo HVB-1 não apresenta grande interferência sobre a fertilidade das fêmeas, no entanto a inseminação artificial com sêmen contaminado pode ocasionar sérias perdas reprodutivas às vacas inseminadas. Segundo PHILPOTT (1993), o risco da transmissão da doença através da transferência de embrião parece ser de menor importância.

Uma das manifestações mais graves da doença, que justamente está envolvida com as altas taxas de descarte dos bovinos em produção, é o aborto. Normalmente o aborto ocorre após exposição natural da doença,

quando o vírus se replica no trato respiratório superior e migra pela corrente circulatória para o útero da vaca gestante. Uma vez no útero, o feto é infectado e após 1 a 3 dias de iniciada a replicação viral no feto, este morre e o aborto ocorre 2 a 7 dias após a morte fetal.

Todos estes distúrbios reprodutivos são dependentes das estruturas envolvidas e do estágio gestacional, onde normalmente se encontra: infertilidade temporária devido à endometrite necrosante; falha da prenhez por ooforite com necrose e hemorragia do ovário e mesmo do corpo lúteo; com a baixa concentração de progesterona, mortalidade embrionária do 7° ao 15° dia, com retorno ao cio em intervalo regular; mortalidade embrionária posterior ao 15° dia, com retorno ao cio a intervalo irregular; mortalidade fetal com conseqüente aborto e eventualmente natimortos, nascimento de animais fracos e mortalidade neonatal (ALFIERI, 2001).

O fator mais importante na cadeia epidemiológica do HVB-1 é o estabelecimento do estado de latência, que é uma característica comum a todos os *Herpesvirus*. Nesta situação, o vírus permanece em células ganglionares nervosas do animal infectado sem despertar o sistema imune do animal. O vírus em latência não é detectado por procedimentos diagnósticos convencionais e pode apresentar subseqüentes e intermitentes episódios de re-excreção viral, não acompanhada de sinais clínicos muitas vezes. Com isto o animal uma vez infectado por HVB-1, será portador e potencial transmissor do vírus por toda a sua vida produtiva (ALFIERI, 2001).

Este ponto é de fundamental importância para o estabelecimento e a compreensão das estratégias de controle para Rinotraqueíte Infecciosa Bovina. Nas infecções herpéticas agudas, humanas e animais, são importantes tanto a imunidade humoral quanto a imunidade celular. Na resposta imune humoral os anticorpos, por impedir a adsorção e a penetração do vírus à célula hospedeira, são responsáveis pela neutralização viral. Os anticorpos também estão envolvidos na lise de células infectadas que

expressam antígenos virais em sua superfície. Esta lise pode ser mediada pelo complemento ou por processo citotóxico dependente de anticorpo.

A imunidade celular inespecífica é exercida por uma série de células efectoras como macrófagos e neutrófilos polimorfonucleados, entre outras células, que eliminam as células infectadas por vírus, tanto direta quanto indiretamente, por meio da interação com anticorpos. Na reativação de uma infecção herpética em animais portadores, ou seja, quando o vírus sai do estado de latência, o HVB-1 promove a formação de pontes intercelulares. Desta forma o vírus consegue passar de célula a célula sem entrar em contato com o espaço extracelular e líquidos corporais, não sendo assim disponível para atuação dos anticorpos. Nesta situação, em termos imunológicos assume grande importância a imunidade celular citotóxica, que é capaz de destruir as células infectadas, impedindo o transporte viral, bem como sua eliminação no meio ambiente (ALFIERI, 2001).

Em resumo pode-se dizer que os anticorpos são fundamentais na prevenção da infecção, enquanto a imunidade celular citotóxica está diretamente relacionada à recuperação da infecção e, indiretamente, à redução da transmissão. Contudo, nenhum destes eventos ocorre isoladamente no organismo. Há a necessidade de uma harmonia entre as imunidades humoral e celular, pois uma falha em um sistema terá como consequência uma influência negativa sobre o outro.

Os *Herpesvirus* estão presentes em plantéis de bovinos de praticamente todo o mundo. As taxas de rebanhos e animais portadores do vírus apresenta grandes variações na dependência da região estudada, do tipo de exploração, da amostragem e também da metodologia utilizada no diagnóstico. Na Europa, alguns países obtiveram a condição de país livre e/ou sob rígido controle, graças a um programa intensivo de controle. Outros países europeus apresentam prevalências que variam de 20 a 80%, conforme a região estudada, segundo estudos realizados por OIRSCHOT (1996).

Nos Estados Unidos e Canadá, onde a infecção tem caráter endêmico as prevalências também são bastante altas. Encontram-se nestas regiões rebanhos livres, destinados a produção de sêmen ou embriões, devido ações isoladas da iniciativa privada.

Segundo dados de ALFIERI (2001), levantamento realizado por RICHTZENHAIN (1998) em amostras de soro bovino provenientes de rebanhos do Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, encontrou uma prevalência média de 69% dos animais soropositivos.

Levantamento sorológico realizado em amostras de soro bovino, foi realizado por ALFIERI (2001), entre os anos de 1996 e 1998, onde encontrou-se a seguinte situação:

TABELA 1. Distribuição da freqüência de amostras de soro bovino, positivas e negativas para anticorpos anti HVB-1, identificadas pelo teste de ELISA.

ESTADO	POSITIVO (%)	NEGATIVO(%)	
TOTAL			
PR	2.236 (54,3)	1.881 (45,7)	4.117
RS	164 (44,4)	205 (55,6)	369
MG	45 (84,9)	8 (15,1)	53
SP	277 (74,9)	93 (25,1)	370
RJ	17 (70,8)	7 (29,2)	24
RO	52 (91,2)	5 (8,8)	57
MS	930 (75,8)	296 (24,2)	1.226
MT	535 (75,7)	172 (24,3)	707
SC	63 (42,3)	86 (57,7)	149
GO	675 (73,8)	239 (26,2)	914
TOTAL	4.994 (62,5)	2.992 (37,5)	7.986

Fonte: ALFIERI (2001)

As freqüências de animais e rebanhos soropositivos indicam que no Brasil a infecção por HVB-1 apresenta caráter endêmico, tanto em plantéis destinados à produção de leite quanto de carne, e esta situação inviabiliza, a curto prazo, uma política nacional de erradicação, denotando ainda mais o grande objetivo, que é a utilização de estratégias eficazes de controle, com programas coerentes de vacinação e identificação dos animais doentes.

3.3 LEPTOSPIROSE

A Leptospirose é uma zoonose de ampla difusão em todo o mundo, causada por bactérias em forma de espiroquetas, mais especificamente do gênero *Leptospira*, que determina elevados prejuízos econômicos à pecuária bovina, pelo comprometimento do desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos (LILENBAUM, 1996).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1880, no Cairo, por LARREY, a cujos estudos seguiram-se vários outros. Foi WEIL, porém, que, em 1886, descreveu minuciosamente a doença, observando quadros clínicos em seres humanos (GUERREIRO, *et al*, 1984). Segundo o Manual de Leptospirose do Ministério da Saúde, no Brasil, os primeiros registros sobre Leptospirose foram publicados no Rio de Janeiro, em 1917, por ARAGÃO, e em 1918 NOGUCHI estabeleceu o gênero *Leptospira*, tendo em vista a bactéria possuir forma espiralada.

Reconhece-se na classificação atual dois grandes grupos de espécies de *Leptospira*, as patogênicas, cujo principal representante é a *L. interrogans* e as saprófitas, como a *L. biflexa*.

Devido suas características morfológicas e culturais serem semelhantes, a classificação das Leptospiras depende geralmente de suas características antigênicas verificadas nas provas de aglutinação microscópica, utilizando-se anti-soros específicos para cada variante sorológica, observando-se aquelas que apresentam aglutinógenos comuns e são reunidas em

sorogrupos; o anti-soro que mostra o título mais alto de reação cruzada em cada sorogrupo se presta para representá-lo e para examinar um cultivo que não se conhece. Estabelecido o sorogrupo, o isolamento em estudo é desafiado com um anti-soro de cada uma das variantes sorológicas conhecidas do grupo para selecionar os que estão mais estreitamente relacionados; estes anti-soros específicos para cada variante sorológica são comparados então com o isolamento mediante provas cruzadas de aglutinação-absorção para sua identificação definitiva.

A unidade taxonômica então encontrada é o sorovar, representado por uma "amostra de referência".

A Leptospirose é uma zoonose, na qual os animais são hospedeiros primários, essenciais para a persistência dos focos da infecção, e os seres humanos são hospedeiros acidentais, terminais, pouco eficientes na perpetuação da mesma. Estes fatos ressaltam a importância do direcionamento das ações preventivas para os animais vertebrados que se comportam como reservatórios de leptospiras.

Os mais importantes reservatórios domésticos são os bovinos, suínos, caninos, ovinos e caprinos que podem apresentar-se em um estado de portadores renais crônicos e leptospirúria por meses a anos, sendo este o principal fator na transmissão da doença ao homem.

Os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença, pois são portadores sadios, albergando a leptospira nos rins, eliminando-a viva no meio ambiente por muitos anos, constituindo-se num portador são universal, contaminando assim água, solo e alimentos. Nos países localizados em regiões tropicais e subtropicais, em áreas metropolitanas, o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é considerado o mais importante transmissor dessa zoonose para o homem.

No meio rural, o rato e principalmente os roedores silvestres também assumem posição de destaque, servindo como fonte de infecção à criação e ao próprio homem, mas são os próprios animais os principais

reservatórios, servindo como fonte de disseminação para o rebanho e para o homem.

Bovinos de ambos os sexos são acometidos, entretanto as perdas são mais significativas em fêmeas, e em relação ao manejo empregado, rebanhos leiteiros são mais susceptíveis à presença de animais infectados.

A transmissão da *Leptospira* pode ocorrer pelo contato direto com a pele, mucosa oral e conjuntival, com a urina e/ou órgãos de animais portadores de *Leptospiras*. A via respiratória torna-se importante para o rebanho pela proximidade dos animais, por meio de gotículas contaminadas, como a urina e o leite. Nos rebanhos bovinos a via venérea, transplacentária e mamária ou até o hábito de limpeza da genitália, escroto, tetos ou outras partes entre animais, pode constituir-se em rotas importantes de transmissão (OLIVEIRA, 2000).

Levantamentos sorológicos realizados em todo mundo indicam uma prevalência maior de alguns sorovares, para a Leptospirose bovina. MADRUGA (1982), no Mato Grosso do Sul, aponta os sorovares *hardjo*, *sejroe* e *wolffi* como os mais freqüentes em estudos sobre desempenho reprodutivo de fêmeas nelores.

Freqüência semelhante também foi constatado por LANGONI (2000) e FREITAS (2000). Além dos três sorovares citados, estes autores encontraram freqüência relativamente altas para os sorovares *pomona*, *bratislava*, *bataviae* e *icterohemorragiae*.

Trabalho realizado por RIBEIRO (2000), em Minas Gerais, pesquisando cinco diferentes sorovares em bovinos, encontrou os sorovares *hardjo* e *wolffi* como os mais prevalentes, o que também é confirmado pelas pesquisas de THIERMANN (1982) nos Estados Unidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta análise epidemiológica fundamentou-se em um estudo de estimativa, por partir de hipóteses gerais de que haveria uma certa porcentagem, embora desconhecida, de vacas reagentes positivas, oriundas das fazendas leiteiras e agora descartadas no abatedouro, aos antígenos específicos para leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina.

Os animais pesquisados foram selecionados no abatedouro, utilizando-se como critério o sexo dos animais, sendo todas as amostras de fêmeas bovinas da raça holandesa, e animais que não haviam recebido vacinas para nenhuma das três doenças em questão. Este ponto foi assegurado pelo inquérito dos produtores que destinavam seus animais ao abatedouro. A partir da seleção dos animais para teste, identificou-se a idade dos animais bem como de qual bacia leiteira este originava-se.

Entre os meses de março e setembro de 2000, procedeu-se a coleta de material das vacas presentes no abatedouro, que enquadravam-se nos critérios adotados, perfazendo um total de 431 amostras. Estes animais selecionados eram oriundo das bacias leiteiras de Castro, Arapotí, Carambeí e Lapa.

Para que se realizasse o exame dos animais para as doenças em questão, obteve-se o soro sanguíneo dos mesmos pelo seguinte protocolo: os animais foram identificados antes do abate e só então seguiu-se a dessensibilização dos mesmos com uso de pistola com dardo cativo. Em seguida, já dentro do abatedouro, os animais eram lavados e suspensos para a execução da sangria. Neste momento, durante a sangria do animal pela secção da veia jugular, uma alíquota do sangue foi coletada em tubo de ensaio estéril devidamente identificado. Após a coleta de todos os animais selecionados no dia, os tubos de ensaio eram levados ao laboratório onde obteve-se o soro sanguíneo não hemolisado. A partir da amostra de soro, separou-se quatro

alíquotas para o exame das três doenças e uma para armazenamento para possíveis contra-provas.

Este soro obtido foi então congelado e em seguida encaminhado ao laboratório para execução dos testes específicos para cada doença.

PROVAS DIAGNÓSTICAS DAS DOENÇAS ESTUDADAS

4.1 DIARRÉIA VIRAL BOVINA

Para a detecção dos soros positivos para diarreia viral bovina, empregou-se a técnica de ELISA de Captura, com anticorpos monoclonais, a fim de verificar anticorpos específicos nos soros originários dos animais.

O princípio deste teste (*Ceditest®*) constitui no emprego de dois anticorpos monoclonais que reconhecem dois diferentes epítomos da proteína não estrutural P₈₀. Um anticorpo monoclonal (WB112) está revestindo a placa de ELISA. A amostra de soro em teste foi então incubada simultaneamente com o antígeno da BVDV (cepa *oregon*) nos pocinhos da placa de ELISA durante 60 minutos. Após esse período de incubação, esta placa foi lavada e incubada novamente com a adição de outro anticorpo monoclonal peroxidase-conjugado (WB103) por mais 60 minutos.

Ao fim desta incubação, a placa foi lavada novamente e uma solução com cromógeno (corante) é adicionada aos pocinhos. Após 15 minutos a coloração foi interrompida e então procedeu-se a leitura.

Durante o primeiro período de incubação, em caso de soros positivos, os anticorpos para diarreia viral bovina presentes no soro, irão bloquear (ligar-se) o antígeno adicionado simultaneamente, e durante o primeiro processo de lavagem o complexo antígeno/anticorpo será retirado da placa. Consequentemente o anticorpo conjugado com a peroxidase não encontrará sítio de ligação e não poderá ligar-se ao cromógeno adicionado, não alterando a cor, indicando que a amostra é positiva para BVDV. Se a amostra em questão for negativa, o antígeno da BVDV irá ligar-se ao anticorpo

monoclonal da placa de ELISA e no próximo passo o anticorpo conjugado irá ligar-se ao antígeno também. Sendo assim o cromógeno se ligará ao anticorpo conjugado com a peroxidase alterando a cor, indicando que a amostra em questão é negativa, não possuindo anticorpos contra diarreia viral bovina.

Em resumo o resultado deste teste é dependente da quantidade de anticorpos presente na amostra do soro a ser testada. Se houverem no soro muitos anticorpos, suficientes para ligar-se na maioria das partículas antigênicas, não haverá sítios disponíveis para a ligação do anticorpo peroxidase conjugado e da mesma maneira para a ligação do cromógeno.

A leitura das placas é realizada em espectrofotômetro, onde se medirá a densidade ótica até 450 nm (=OD₄₅₀), obtendo-se melhor resultado nos primeiros 15 minutos após a interrupção da coloração. Esta leitura ótica é totalmente dependente da quantidade de anticorpos presentes no soro, sendo positivos os soros onde a porcentagem de inibição é maior ou igual a 50%.

4.2 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA

Para a detecção das amostras positivas para rinotraqueíte infecciosa bovina utilizou-se a técnica de soroneutralização viral, conforme recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE). Existem diversas modalidades para a prova de neutralização viral, que variam conforme a cepa do vírus, a diluição inicial do soro, o período de incubação da mistura vírus/soro, o tempo transcorrido até a leitura, entre outros. De todas essas variáveis, o tempo de incubação vírus/soro é o que exerce maior influência sobre o título dos anticorpos.

Quanto maior o tempo de incubação, até o limite estabelecido, maior a sensibilidade para a detecção dos animais positivos.

A metodologia se procedeu da seguinte forma: os soros a serem testados, foram inativados em banho maria a 56°C durante 30 minutos. A partir daí, os soros suspeitos são submetidos a uma série de diluições na razão 2,

em meio de cultivo celular. A partir de um soro não diluído, se efetuam diluições sucessivas em uma placa de microtitulação com 96 pocinhos até alcançar uma diluição de 1/1024. Em cada pocinho deve utilizar-se 50µl da diluição. Se inclui também diluições de um soro controle positivo, um fraco positivo e um negativo. Em um pocinho adicional se coloca o soro não diluído, a fim de se obter um controle da toxicidade dos soros.

Após estas diluições, se adiciona a cada pocinho 50µl da suspensão padrão de HVB-1, diluída em meio de cultivo a fim de proporcionar 100 DICC50 (dose infectante de cultivo celular 50%) por pocinho. Nos pocinhos reservados ao controle de toxicidade do soro, se coloca 50µl de meio de cultivo celular ao invés do vírus.

As placas são incubadas a 37°C durante 18 – 24 horas. Em seguida, adiciona-se em cada pocinho da placa 100µl da suspensão celular, na razão de 3×10^4 células (célula de rim bovino, linhagem *Madin Darby*). Novamente então incubam-se as placas a 37°C durante 3 a 5 dias. Após esta incubação, procede-se a observação microscópica para a verificação então do título final, o qual corresponde ao da maior diluição que apresente monocamada celular íntegra, ou seja, sem efeito citopático. Se considera positivo toda neutralização que produz um título igual ou superior a 1 (seguindo a convenção da diluição inicial). Quando observa-se citotoxicidade no pocinhos de controle de citotoxicidade do soro, deve simplesmente registrar-se que a amostra é tóxica (sem resultado), a não ser que se detecte neutralização viral sem citotoxicidade nas diluições mais altas e que seja possível determinar um título sem ambigüidade. Em todas as amostras estudadas não houveram casos de toxicidade.

4.3 LEPTOSPIROSE

Para o diagnóstico da leptospirose empregou-se a técnica de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, segundo o Manual de Leptospirose do Ministério da Saúde (1995)

Para a detecção de anticorpos anti-leptospiras utilizou-se os seguintes antígenos:

TABELA 2 – Sorovares de leptospirose utilizados na soroaglutinação microscópica

<i>L. icterohaimorrhagiae</i>	<i>L. copenhageni</i>	<i>L. javanica</i>
<i>L. canicola</i>	<i>L. pyrogenes</i>	<i>L. castellanis</i>
<i>L. cynopteri</i>	<i>L. autumnalis</i>	<i>L. sentot</i>
<i>L. australis</i>	<i>L. pomona</i>	<i>L. grippotyphosa</i>
<i>L. hebdomadis</i>	<i>L. wolffi</i>	<i>L. saxckoebing</i>
<i>L. sejroe</i>	<i>L. bataviae</i>	<i>L. hardjo</i>
<i>L. tarassovi</i>	<i>L. panama</i>	<i>L. andamana</i>
<i>L. bratislava</i>	<i>L. shermani</i>	<i>L. patoc</i>
<i>L. djasiman</i>		

O diagnóstico sorológico da leptospirose compreende duas etapas:

A) TRIAGEM

- As amostras do soro foram diluídas em solução salina a 1:50 e distribuídas em uma estante de tubos, num volume de 0,2ml por tubo,
- Em cada tubo foi acrescentado o volume de 0,2ml de suspensão antigênica correspondente,

- A mistura de soro e antígeno foi incubada em temperatura ambiente durante duas horas e a seguir procedeu-se a leitura em microscópio com condensador de campo escuro e objetiva de longa distância, atentando-se para a presença de aglutinação.

B) FASE DE TITULAÇÃO

- Os soros que, na prova de triagem, mostraram reação de aglutinação, foram reexaminados com os antígenos reacionantes em uma série de diluições geométricas de razão 2. O procedimento para mistura, incubação e leitura destas diluições é o mesmo da prova de triagem.
- O título de aglutinação do soro é expresso pela recíproca da diluição,
- As amostras que apresentaram reação de aglutinação com titulação maior ou igual a 1:100, com um ou mais dos 25 sorovares testados, foram consideradas positivas,
- As amostras que não apresentaram reação de aglutinação a nenhum dos antígenos foram consideradas negativas.

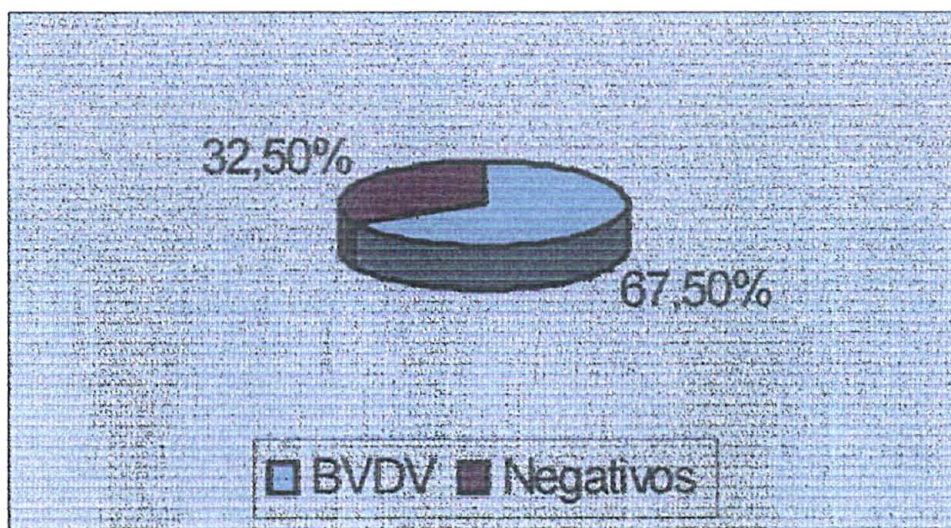
5. RESULTADOS

Foram analisadas globalmente 431 amostras de soro, obtidas de vacas leiteiras no abatedouro. Todas as amostras foram analisadas conforme a metodologia já descrita, resultando em dados que devem ser analisados por diferentes aspectos. Os resultados obtidos são descritos abaixo em quatro etapas, sendo três referentes às prevalências individuais de cada doença e uma quarta etapa analisando-se todas as combinações possíveis dos resultados, a fim de identificar correlações entre estas doenças.

5.1 DIARRÉIA VIRAL BOVINA

A prevalência de vacas reagentes ao teste de anticorpos monoclonais para BVDV foi de 67,5% (291/431) (GRÁFICO 1).

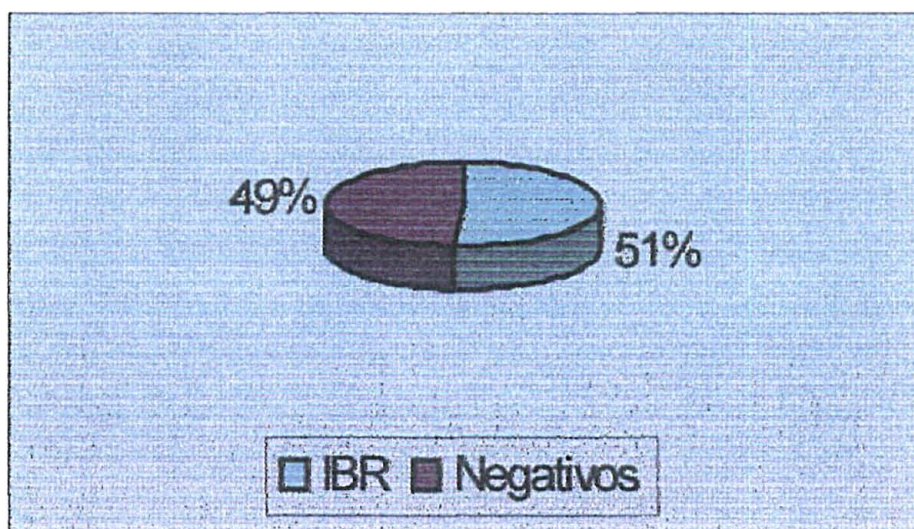
GRÁFICO 1 - Prevalência da Diarréia Viral Bovina em vacas leiteiras descartadas



5.2 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA

A prevalência de vacas reagentes ao testes de Soroneutralização para IBR foi de 51% (221/431) (GRÁFICO 2).

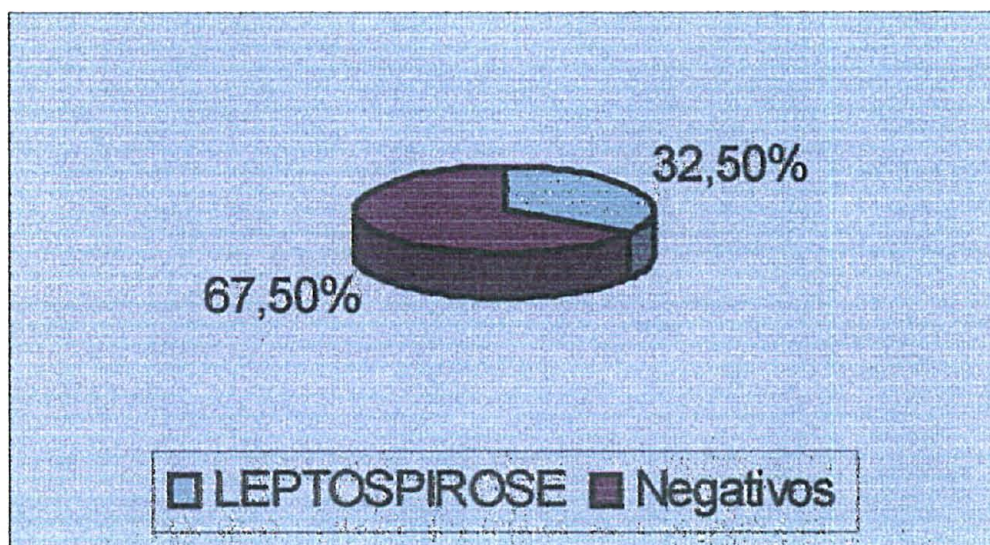
GRÁFICO 2 - Prevalência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em vacas leiteiras descartadas



5.3 LEPTOSPIROSE

A prevalência de vacas que reagiram positivamente a algum dos 25 antígenos testados foi de 32,5% (140/431) (GRÁFICO 3).

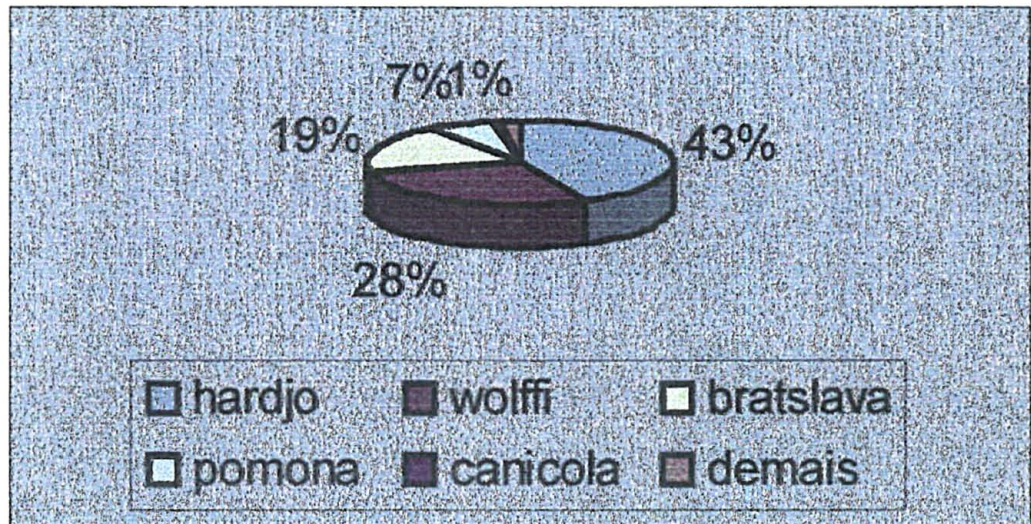
GRÁFICO 3 - Prevalência da Leptospirose em vacas leiteiras descartadas



Muitos animais positivos apresentaram reações múltiplas a dois ou mais antígenos testados para a leptospirose, no entanto as maiores incidências foram para alguns antígenos em particular.

O sorovar mais freqüente em todos os casos foi a *L. hardjo*, presente em 43% das amostras positivas. Em seguida a *L. wolffi* apresentou – se em 28% das amostras positivas. *L. bratislava* foi encontrada em 19% das reações e *L. pomona* em 7%. Em menor quantidade ainda houveram reações de aglutinação para as leptospirosas *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *sejroe* e *hebdomadis*. (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4 – Frequência de sorovares de *Leptospira* em vacas leiteiras descartadas positivas para leptospirose.

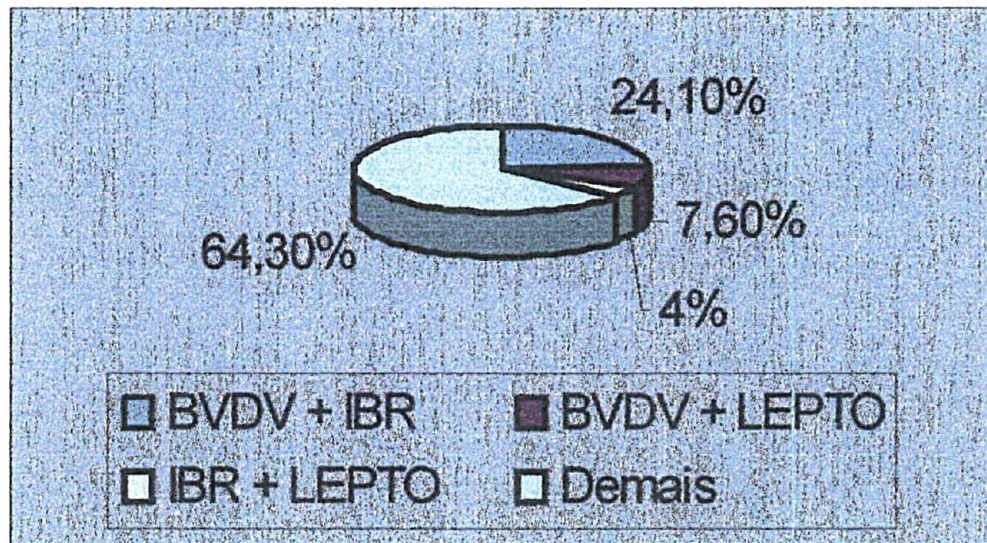


5.4 CORRELAÇÕES

Analisando-se o total de amostras positivas para pelo menos uma doença, várias considerações podem ser aventadas, quando verifica-se a presença de uma ou mais doenças ou mesmo a ocorrência de uma única.

Ao se considerar a ocorrência de duas ou mais doenças associadas, observou-se que 24,1% (104/431) dos animais reagiram positivamente para BVDV e IBR simultaneamente, sendo negativos para leptospirose. Os animais que foram positivos para BVDV e leptospirose e negativos para IBR somaram 7,6% (33/431) e a ocorrência de IBR associada a leptospirose foi de 4% (17/431) (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 – Prevalência sorológica de duas ou mais doenças associadas



Encontrou-se 16,2% (70/431) dos animais positivos para as três doenças em questão ao mesmo tempo (GRÁFICO 6) e 18,8% (81/431) dos animais apresentaram-se negativos para as mesmas três doenças (GRÁFICO 7).

GRÁFICO 6 – Porcentagem de animais positivos para as três doenças

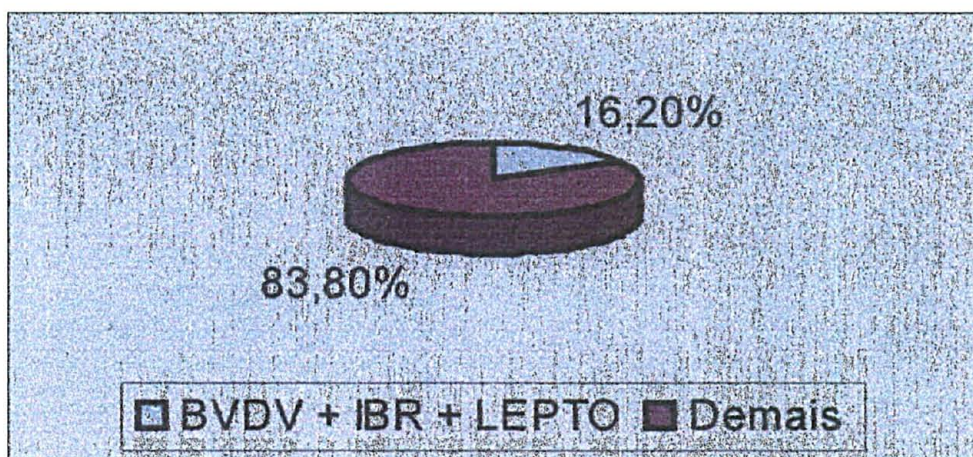
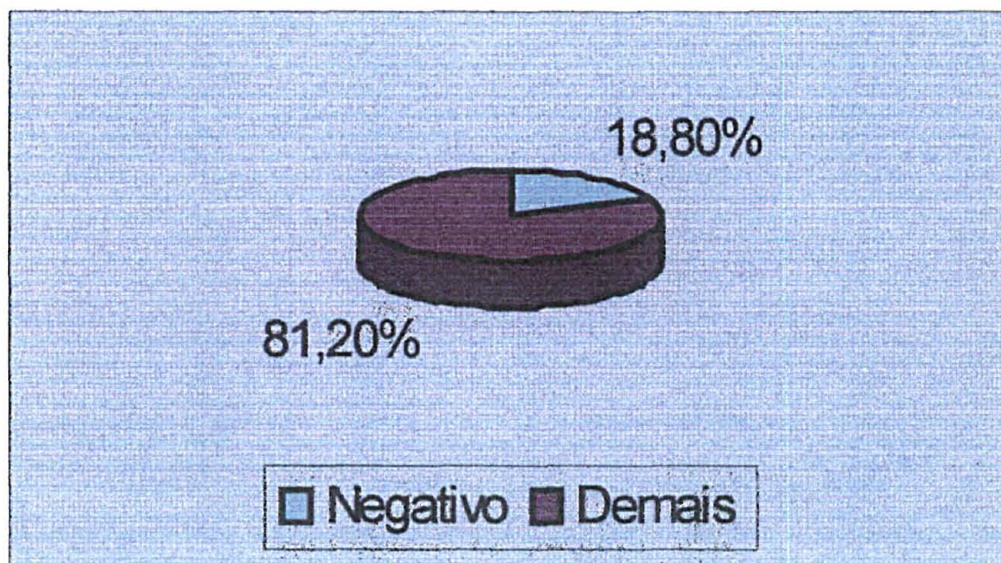


GRÁFICO 7 - Porcentagem de animais negativos para as três doenças (%)



Dos 431 animais testados, 18,5% (80/431) apresentaram-se positivos apenas para diarreia viral bovina, sem que houvessem reações positivas para as outras duas doenças (GRÁFICO 8). Da mesma maneira, 6,4% (28/431) dos animais reagiram positivamente apenas para rinotraqueíte infecciosa bovina (GRÁFICO 9) e 4,2% (18/431) dos animais apresentaram leptospirose isoladamente (GRÁFICO 10).

GRÁFICO 8 – Porcentagem de animais positivos apenas para BVDV

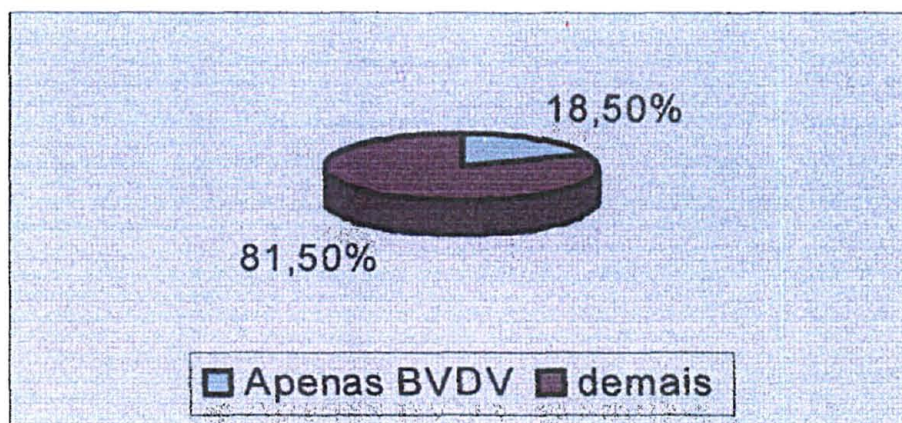


GRÁFICO 9 – Porcentagem de animais positivos apenas para IBR/IPV

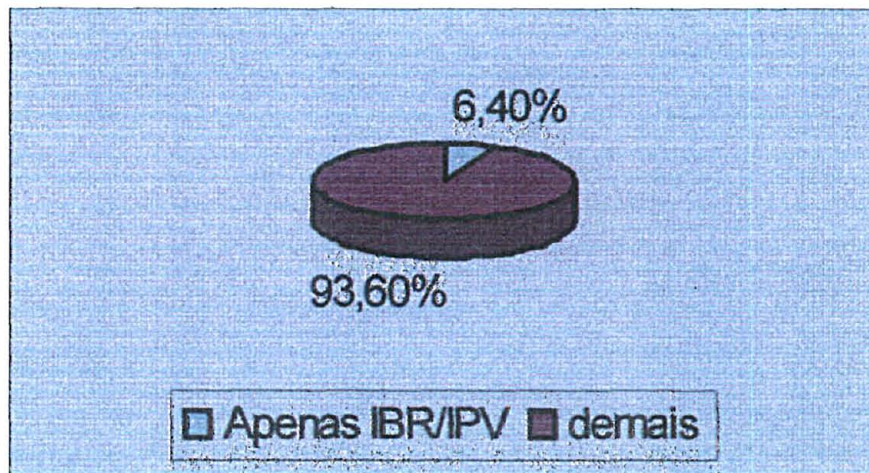
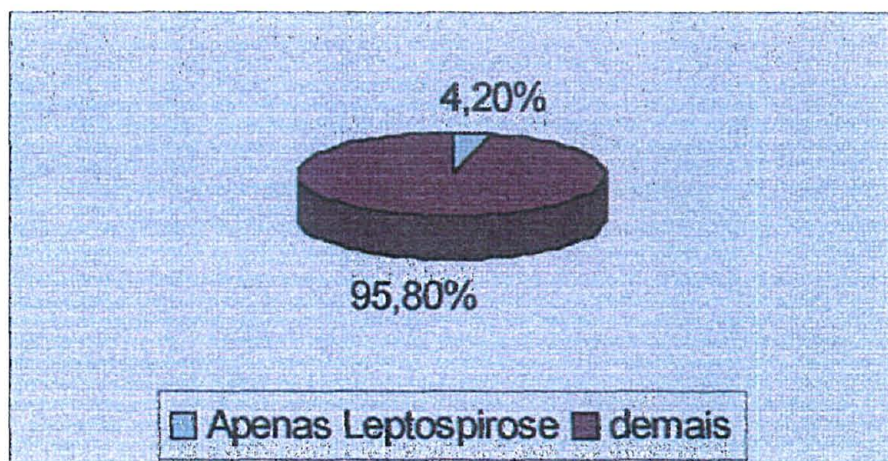


GRÁFICO 10 – Porcentagem de animais positivos apenas para Leptospirose



6. DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa evidenciaram uma situação preocupante, determinada pelas altas taxas de prevalência encontradas para as três doenças estudadas. A taxa de prevalência para BVDV nesta pesquisa foi de 67,5%, o que pode ser considerado alto, já que tratam-se de animais oriundos, na sua grande maioria, de fazendas leiteiras produtoras de leite B, ou seja, propriedades onde o manejo sanitário e nutricional segue normas pré-estabelecidas que visam minimizar os prejuízos.

Apesar deste índice assemelhar-se muito a outros determinados por outras pesquisas, tanto no Brasil como em outros países, justifica-se de certa maneira estes valores, por se tratarem de animais descartados, os quais por algum motivo não conseguiram manter o seu potencial produtivo, tornando-se a eliminação dos mesmos a alternativa mais viável.

Neste universo de animais descartados, constatou-se que em muitos casos a BVDV, estando presente, pode ter influenciado na queda produtiva dos mesmos, ocasionando o descarte. Neste ponto se discute as reais estratégias utilizadas atualmente no controle de tais doenças.

Seguramente os sistemas de criação empregados na atualidade, aliados à falhas no manejo sanitário, condicionam uma maior disseminação da infecção, verificada em várias regiões.

Da mesma maneira, a taxa de prevalência da IBR de 51,2% também pode ser considerada alta, sofrendo as mesmas influências no que diz respeito às falhas no manejo, determinando o controle ou não da doença.

Várias evidências sugerem que o vírus da diarreia viral bovina é imunossupressivo nos bovinos e que animais infectados podem apresentar aumentos significativos na ocorrência de outros patógenos. Uma leucopenia transitória ocorre na maioria dos bovinos infectados com BVDV e a depleção dos tecidos linfóides é encontrada freqüentemente post-mortem (POTGIETER, 1995).

O mesmo autor mostra evidências experimentais da interação da BVDV com outros patógenos, principalmente o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), estudando a permanência do vírus HVB-1 após inoculação em tecidos do trato respiratório de bezerros controle e bezerros infectados com o BVDV.

Todas estas evidências associadas aos resultados desta pesquisa, devem ser consideradas no entendimento de que a BVDV pode ser um componente chave na múltipla etiologia de várias doenças

Como pode-se observar nos resultados, todas as prevalências envolvendo a BVDV, tanto isolada como associada com outras doenças, são maiores do que quando se considera a prevalência das outras doenças envolvidas no estudo, o que sugere que o efeito imunossupressivo do vírus tem realmente um importante papel no desenvolvimento de várias síndromes clínicas.

Esta alta prevalência denota que existem falhas nos manejos sanitários empregados em muitas propriedades, o que pode ser observado não só pela presença das doenças nos animais amostrados, mas também pela constatação nas propriedades de que os programas preventivos instituídos, não seguem muitas vezes uma conduta técnica, orientada por um profissional competente ou idôneo. O que se observa é que muitas vezes estes programas são aplicados sob orientação de laboratórios com interesses comerciais, ou mesmo porque o vizinho começou a implantar um programa, e este protocolo é também aplicado na propriedade, o que na maioria das vezes não resolve os problemas presentes.

Nos vários países europeus onde estas doenças foram controladas ou erradicadas, extensivos esforços são realizados para a conscientização do produtor de que é necessário uma atuação conjunta do médico veterinário, inicialmente na identificação do problema, para o estabelecimento futuro de um programa de controle.

Em muitas situações em nossos rebanhos, os animais são vacinados com vacinas polivalentes, sem que haja sequer a identificação de um caso positivo na propriedade, e o que é mais grave, com a garantia de que apenas a vacinação do rebanho é suficiente para o controle destas doenças. Como já relatado anteriormente, esta estratégia é deficiente tratando-se principalmente da BVDV, onde deve haver antes de mais nada a identificação do animais PI por meio de isolamento viral ou sorologia pós-vacinal, e a eliminação dos mesmos.

Também no caso da IBR, como após a infecção este animal torna-se portador da doença, as estratégias de controle devem ser mais amplas, envolvendo toda região produtora e mesmo assim há uma dificuldade muito grande em se instituir programas eficientes no controle da doença.

Muitas dúvidas ainda existem em nosso país quanto a eficácia das vacinas para BVDV e IBR. No caso da BVDV, as vacinas liberadas no território nacional são elaboradas com vírus inativados, que oferecem segundo evidências práticas e experimentais, períodos protetivos curtos, variando entre 4 e 6 meses (BOLIN, 1995; DUBOVI *et al*, 1992; FREDRISKEN *et al*, 1999).

No caso da IBR, recentemente tem se utilizado vacinas com vírus vivos mutantes chamados termosensíveis, o que teoricamente oferece uma proteção maior do que as vacinas com vírus inativados por estimularem mais fortemente a imunidade celular. A melhora nos resultados ainda carece de mais estudos mas de qualquer maneira estas novas tecnologias apontam para um caminho promissor.

Considerando-se as particularidades referentes ao efeito de cada vacina, neste estudo em particular, as altas prevalências encontradas podem ser justificadas pela ausência de programas integrados de controle, que contemplem tanto interesses comerciais com de saúde do rebanho, pois nestas fazendas produtoras de leite que originaram estas amostras, ficam os criadores, na maioria das vezes, desamparados, acumulando prejuízos sem encontrar a melhor saída para uma crise que é ainda maior.

A leptospirose com uma prevalência menor, de 32,5% (140/431), oferece ainda outros riscos pelo aspecto de saúde pública. Esta presença constante da leptospirose nas amostras testadas denota que além do problema clássico na área urbana, devido à presença de ratos, a doença está disseminada no meio rural.

Da mesma forma que para as outras doenças o controle da leptospirose é carente, tanto no que se refere ao uso de vacinas eficazes e utilizadas da forma correta, quanto a programas ambientais que visem minimizar os vetores da doença.

Como em muitas amostras a presença da leptospirose associada à BVDV é maior do que quando associada à IBR, pode-se deste fato também ratificar a suspeita da característica imunossupressiva da BVDV, facilitando talvez a instalação de doenças como a leptospirose, muitas vezes secundárias à BVDV.

Um outro fato importante diz respeito à incidência maior de alguns sorovares de leptospira, o que deve ser levado em conta na formulação de vacinas eficazes para determinadas situações. Nestes caso a ocorrência de *L. bratislava* (19%) chama a atenção, pois a grande maioria das vacinas comerciais para leptospirose não apresenta na sua formulação este sorovar e nenhum outro do mesmo sorogrupo, o que poderia estimular uma imunidade cruzada.

O enfoque mais globalizado da situação evidencia um quadro potencialmente crítico, onde a verificação das altas prevalências de BVDV, IBR e leptospirose representa não só a deterioração das condições de saúde da maioria dos animais testados e mais amplamente dos rebanhos, mas também a falta de um programa eficaz no controle destas doenças, a fim de minimizar a crise vivida pela pecuária leiteira em nosso país.

Este manejo geral falho, por parte dos produtores e das entidades representativas, freqüentemente propicia o convívio íntimo e prolongado de bovinos doentes, fontes naturais e potenciais disseminadores de agentes

infeciosos, com animais sadios, continuamente expostos ao risco de infecções. Nos rebanhos onde isto ocorre, percebe-se a performance produtiva comprometida pela diminuição da produtividade leiteira e do desfrute reprodutivo do rebanho, além de sucessivas condenações de carcaças no abatedouro, um grande aumento nos custos de serviços veterinários e futuramente se enfrentarão problemas com restrições comerciais aos animais e seus produtos, devido pressões de países onde o controle de tais doenças é eficaz.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo realizado em fêmeas bovinas leiteiras descartadas, oriundas das bacias leiteiras de Castro, Arapoti, Carambeí e Lapa, no Paraná, permitiram concluir que:

1. Diarréia Viral Bovina, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Leptospirose encontram-se amplamente distribuídas nos rebanhos das referidas bacias com prevalências de 67,5% (BVDV), 51% (IBR) e 32,5% (leptospirose),
2. Todas as regiões estudadas apresentaram amostras positivas para as três doenças,
3. A Diarréia Viral Bovina provavelmente possui um efeito imunossupressor quando presente no animal, favorecendo o aparecimento de infecções intercorrentes,
4. A presença de sorovares de leptospirose como a *L. bratislava* sugere que a formulação de vacinas deve ser regionalizada,
5. O futuro de pecuária leiteira é dependente do controle destas doenças bem como de outras associadas ao descarte dos animais, a fim de minimizar os prejuízos

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKERMANN, M; SCHWYZER, M ; Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**. V.53 (1-21), p.17-29, 1996.

Disponível em www.elsevier.com/inca/publications/store

Capturado em 20/01/2001

2. ALFIERI, AA; **Rinotraqueite Infeciosa Bovina (IBR): epidemiologia, imunologia imunoprofilaxia.**

Disponível: www.pfizer.com.br

Capturado em 12/05/2001

3. BABIUK, LA; Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v.53 (1-2), p. 31-42, 1996.

4. BAKER,JC; The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infections. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v.11, n.3,p. 427-444, 1995.

5. BARBOSA, EF; Diagnóstico da diarréia bovina à vírus, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.23, n. 4, p.508-514, 1999.

6. BOLIN, SR; Immunogens of bovine viral diarrhea virus, **Veterinary Microbiology**, v.37 (3-4), p. 263-271, 1993.

7. BOLIN, SR; Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v.11, n.3, p.615-625, 1995.

8. BROCK, KV; Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v.11, n.3, p.549-561, 1995.
9. CANAL, CW; STRASSER, M; HERTIG, C; MASUDA, A; PETERHANS, E ; Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.63, p. 85-97, 1998.
10. CASTRO, RS; **Desempenho reprodutivo, até 60 dias de gestação em doadoras de embriões bovinos, frente a infecções por diarréia a vírus, herpes virus bovino tipo 1, leucose e língua azul, em Minas Gerais.** Tese de Mestrado, Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária – Belo Horizonte, UFMG – 1988.
11. **CENSO AGROPECUÁRIO – 1995 – 1996.** Disponível: www.ibge.gov.br
12. CORTESE, VS; WEST, KH; HASSARD, LE; CARMAN, S; ELLIS, JA; Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhoea virus. **JAVMA**. V. 213, n. 9, p.1312-1319, 1998.
13. DBO RURAL – A Revista de Negócios do Criador. Ano 19, n.232 – fev/2000. – DBO Editores Associados Ltda.
14. DIAS, ROS; **Diarréia bovina a vírus: prejuízos no programa reprodutivo.** Disponível: www.milkpoint.com.br/secoes/radar
Capturado em 23/01/01.

15. DUBOVI, EJ; KWANG, J; LITLEDIKE, ET; DONIS, RO; Recombinant polypeptide from the GP48 region of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detects serum antibodies in vaccinated and infected cattle. **Veterinary Microbiology**. V.32 (3-4). P.281-292. 1992.

Disponível: www.elsevier.com/inca/publications/store

Capturado em 20/01/2001

16. DUTRA, ES; **Vacina contra leptospirose previne colonização renal e eliminação pela urina**. Disponível: www.beefpoint.com.br/secoes/radar

Capturado em 01/10/2001.

17. ENGELBURG, FAC van; SCHIE, FW van; RIJSEWIJK, FAM; OIRSCHOT, JT van. Excretion of bovine herpesvirus – 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal of clinical microbiology**. V.33(2), p.308-312 , 1995.

18. FLORES, EF, *et al*; Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, n.1, 2000.

19. FREDRIKSEN, B; SANDVIK, T; LOKEN, T; ODEGAARD, A; Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Record**, v. 144, p. 111-114, 1999.

20. FREITAS,JC; RODRIGUES,CG; MÜLLER,EE; **Leptospirose Bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil – 1998**.

Disponível: www.ufsm.br/ccr/revista/rv292

Capturado em 11/04/2000

21. FULTON, RW, BURGE, LJ; d'OFFAY, JM; PAYTON, ME; Serum antibody response in calves receiving modified live and/or inactivated vaccines containing Bovine Herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea Virus, Parainfluenza-3 virus, and Bovine Respiratory Syncytial virus immunogens. **The Bovine Practitioner**. N.31.2, 1997.
22. GOMES,ST. **Diagnósticos e perspectivas da produção de leite no Brasil**. Juiz de Fora, EMBRAPA – CNPGL (Centro Nacional de Pesquisa de Gado Leiteiro), 1996.
23. GUERREIRO, MG, *et al*, Bacteriologia Especial, Editora Sulina – 1984.
24. GUIMARÃES, PLSN; Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em bovinos com pododermatite. (Resumo de Tese), **Veterinária Notícias**, v. 6, n. 1 , p.133-134, 2000.
25. HEINZ-JÜRGEN, T, *et al*. Pestiviruses. **Fields Virology**. 3º ed., v.1, p.1059-1073, 1995.
26. HEWICKER-TRAUTWEIN, M *et all*; Infection of ovine fetal brain cell cultures with cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v.33 (1 – 4), 1992.
27. HOUE, H; **Epidemiology and economical importance of BVDV infections**. Disponível: www.vu-wien.ac.at/i123/Epidemio/HOUE.html.
Capturado em 09/02/2001.
28. LANGONI, H, *et all*; Inquérito sorológico para a rinotraqueíte infecciosa bovina (RIB) e diarreia a vírus dos bovinos (DVB). **Veterinária Notícias**, v.5, n.2, p. 121-124, 1999.

29. LANGONI, H. *et al*; **Aglutininas anti-leptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo.** (Resumo), Disponível em www.ufsm.br/ccr/revista/resumos.

Capturado em 11/04/2000.

30. LEITE, RC; Controle de diarréia bovina a vírus (DBV) e riontraqueíte infecciosa bovina (IBR). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.4, p.531-535, 1999.

31. LILENBAUM, W; Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**,v.18,p.9-13, 1996.

32. MADRUGA, CR; *et al*; **Efeito da infecção natural da *Leptospira interrogans sp.* Sobre o desempenho reprodutivo de vacas nelore.** CNPGC – Embrapa, 3p., 1982 (Comunicado Técnico n.15).

33. MAYR,A; GUERREIRO,MG; **Virologia Veterinária**, 2º Edição, Editora Sulina – 1981.

34. MELO, LEH. **Avaliação da intercorrência entre leucose enzoótica, tuberculose e leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do estado de São Paulo.** São Paulo: 1999. 89f. Tese de Doutorado na área de clínica veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

35. MINISTÉRIO DA SAÚDE – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de leptospirose**, 2ª edição, 1995.

36. OFFICE INTERNATIONAL DE EPIZOOTIES – OIE. **Manual of standards for diagnostic tests & vaccines**, 4ª edição, 2000. Disponível em www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_summry.htm

Capturado em 05/07/2001.

37. OIRSCHOT, JT- van; BRUSCHKE, CJM; RIJN, PA – van; **Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea**. *Veterinary Microbiology*, v.64(2-3), p.169-183, 1999.

38. OIRSCHOT, JT- van, KAASHOEK, MJ, RIJSEWIJK, FA. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p.43-54, 1996.

39. OLIVEIRA, AAF; *et al*; Leptospirose bovina: aspectos epidemiológicos clínicos e de diagnóstico. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. n.20, p.45-49, 2000.

40. PATON, DJ; SHARP, G; IBATA, G; Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine diarrhoea virus in pregnant ewes. **Veterinary Microbiology**, v.64 (2 –3), p.185-196, 1999.

41. PHILPOTT, M; The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**. v. 149, p 339-369 – 1993.

42. POTGIETER, LND; Immunology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v.11, n.3, p.501-520, 1995.

43. REIS, RP. **Estrutura produtiva da pecuária leiteira sob condições de intervenção: um estudo de caso em Minas Gerais**. Viçosa, MG: UFV. 150 p. Dissertação (Doutorado em Economia Rural). Universidade Federal de Viçosa, 1994.
44. RIBEIRO, SCA; *et al*; Prevalência da leptospirose em fêmeas reprodutoras bovinas do município de Uberlândia, MG. **Veterinária Notícias**. v.6, n.1, p.69-75, 2000.
45. ROCHA, MA; Diagnóstico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.4, p.535-539, 1999.
46. ROCHA, MA; **Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen**. Disponível: www.ufsm.br/ccr/revista/resumos/rv292/rv292-1019.
Capturado em 11/04/2000.
47. ROEHE, PM; SILVA, AM; *et al*; **Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) – acute and latent infection**. *Veterinary Microbiology*, v.66; p.89-99, 1999.
Disponível: www.elsevier.com/inca/publication/store
Capturado em 20/04/2001
48. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE MG. **Manual de raiva e leptospirose**. Belo Horizonte, 1998.
49. SOCKETT, D; MODDERMAN, E; **Fetal exposure to bovine viral diarrhoea virus despite vaccination in a Wisconsin dairy herd**. Disponível: www.nadc.ars.usd/abstracts/b00029
Capturado em 27/09/1999

50. TIZARD, IR; **Imunologia Veterinária: uma introdução**. Quinta edição – São Paulo, ROCA – 1998.

51. THIERMANN, AB; Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the *hebdomadis* serogroup. **American Journal Veterinary Research**. v. 43 (5), p.780-784, 1982.