

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
E REPRODUÇÃO ANIMAL
CAMPUS DE JABOTICABAL

ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCEPÇÃO E
ENFERMIDADES INFECCIOSAS DA REPRODUÇÃO
EM MATRIZES NELORE

Rafael Massa

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
E REPRODUÇÃO ANIMAL
CAMPUS DE JABOTICABAL

ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCEPÇÃO E
ENFERMIDADES INFECCIOSAS DA REPRODUÇÃO
EM MATRIZES NELORE

Rafael Massa

Orientador: Luis Antonio Mathias

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2012

Massa, Rafael
M414a Associação entre concepção e enfermidades infecciosas da
reprodução em matrizes nelore / Rafael Massa. -- Jaboticabal, 2012
vi, 63 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Luis Antonio Mathias

Banca examinadora: Samir Issa Samara, Edviges Maristela

Pituco

Bibliografia

1. *Bovinos*. 2. Doenças infecciosas. 3. Reprodução. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

e-mail: rmassavet@yahoo.com.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

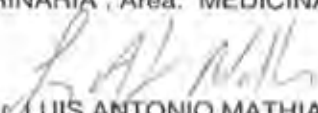
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCEPÇÃO E ENFERMIDADES INFECCIOSAS DA REPRODUÇÃO EM MATRIZES NELORE

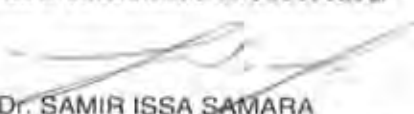
AUTOR: RAFAEL MASSA

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. EDVIGES MARISTELA PITUCO

Instituto Biológico de São Paulo

Data da realização: 22 de junho de 2012.

Dados curriculares do autor

RAFAEL MASSA - Nascido em Ribeirão Preto, São Paulo, em 11 de dezembro de 1984. É médico veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal. Atuou profissionalmente com clínica médica de animais de produção e assistência técnica a produtores rurais. Realizou o curso de pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Campus de Jaboticabal, nível mestrado, recebendo bolsa de estudos pela Capes.

Sumário

<u>RESUMO</u>	v
<u>ABSTRACT</u>	vi
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	7
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA</u>	8
<u>2.1. Caracterização da pecuária de corte no Brasil e distúrbios reprodutivos relacionados</u>	8
<u>2.2. Brucelose bovina</u>	12
<u>2.3. Leptospirose bovina</u>	17
<u>2.4. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina</u>	25
<u>2.5. Diarreia Viral Bovina</u>	29
<u>2.6. Neosporose</u>	34
<u>2.7. Impacto na reprodução</u>	39
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	42
<u>3.1. Rebanho</u>	42
<u>3.2. Formação dos grupos amostrais</u>	42
<u>3.3. Coleta de amostras</u>	44
<u>3.4. Exames laboratoriais</u>	44
<u>3.4.1. Brucelose</u>	44
<u>3.4.2. Leptospirose</u>	45
<u>3.4.3. Rinotraqueíte infecciosa bovina</u>	46
<u>3.4.4. Diarreia viral bovina</u>	47
<u>3.4.5. Neosporose</u>	47
<u>3.6. Análise dos dados</u>	48
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	49
<u>5. CONCLUSÕES</u>	57
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	58
<u>ANEXO 1</u>	63
<u>ANEXO 2</u>	64
<u>ANEXO 3</u>	67

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1: Parâmetros mínimos e altos de eficiência reprodutiva para rebanhos bovinos de corte em regime de criação extensiva.....	10
Quadro 2: Denominação das falhas reprodutivas de bovinos de acordo com o período gestacional de ocorrência.	11
Quadro 3: Causas de perdas reprodutivas em bovinos.....	12
Quadro 4: Concentração viral de excreção do BoHV1 por bovinos.....	28
Quadro 5: Sorogrupos e sorovariedades dos antígenos utilizados na soroaglutinação microscópica.....	46
Quadro 6: Demonstrativo da tabela de contingência..	47
Quadro 7: Interpretação da concordância pelo coeficiente Kappa	48
Tabela 1: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra Brucella abortus por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.....	49
Tabela 2: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra o Herpesvirus Bovino do tipo 1 por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística	50
Tabela 3: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra o Vírus da Diarréia Viral biotipo 1 por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância.....	51
Tabela 4: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra Neospora caninum por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.	51

Tabela 5: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra <i>Leptospira</i> spp. com diferentes pontos de corte por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.	53
Tabela 6: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos com diferentes pontos de corte por agentes etiológicos e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta no período seco, risco relativo (RR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística em novilhas bovinas da raça Nelore.	55

Lista de abreviaturas

µm	=	Micrômetro
AAT	=	Teste do antígeno acidificado tamponado
BoHV	=	Herpesvírus bovino
BVD	=	Diarreia viral bovina
BVDV	=	Vírus da diarreia viral bovina
DCO	=	Doença cística ovariana
g	=	Grama
IBR	=	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IC 95%	=	Intervalo de confiança a 95%
Ig	=	Imunoglobulina
IPV/IPB	=	Vulvovaginite pustular infecciosa/Balanopostite pustular infecciosa
MAPA	=	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MD	=	Doença das mucosas
MDBK	=	Madin Darby Bovine Kidney
mL	=	Mililitro
Nm	=	Nanômetro
OIE	=	Organização Mundial de Saúde Animal
OR	=	Odds Ratio
pH	=	Potencial hidrogeniônico
PNCEBT	=	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
RFC	=	Reação de fixação do complemento
RR	=	Risco relativo
SAM	=	Soroaglutinação Microscópica
TCID ₅₀	=	Dose infectante em cultura de tecido
VERO	=	Linhagem celular derivada do rim do macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
VN	=	Virusneutralização

ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCEPÇÃO E ENFERMIDADES INFECCIOSAS DA REPRODUÇÃO EM MATRIZES NELORE

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da brucelose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD) e neosporose no indicador de reprodução mais comumente utilizado por pecuaristas brasileiros, a taxa de concepção (ou taxa de prenhez) após a estação de monta. Dois estudos epidemiológicos analíticos foram feitos: um estudo caso-controle, utilizando uma amostra das matrizes do rebanho que foram submetidas à estação de monta durante o período chuvoso, e um estudo de coortes retrospectivo, utilizando todas as novilhas submetidas à estação de monta durante a estação de “inverno”. A determinação do estado gestacional foi realizada por palpação retal entre 60 e 90 dias após o término da estação de monta. A pesquisa de anticorpos foi realizada pelos seguintes métodos: antígeno acidificado tamponado (AAT) e reação de fixação de complemento (RFC) para brucelose; soroaglutinação microscópica (SAM) para leptospirose; virusneutralização (VN) para IBR e BVD; e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para neosporose. A significância estatística da associação entre a doença e o fracasso na concepção foi avaliada pelos métodos de qui-quadrado ou teste exato de Fisher ($p < 0,05$) e pelo intervalo de confiança a 95% para o risco relativo (RR) ou a odds ratio (OR). Associações com relação causal possível foram encontradas entre falha na concepção e: infecção considerando qualquer sorovariedade de *Leptospira* spp. (Título ≥ 400) em primíparas (OR = 7,3636, IC 95%: 1,3373-40,5479; significativo), todas as quais foram infecções causadas por *L. Wollfi*; e infecção por *L. Autmumnalis* (título de ≥ 200), considerando todos os animais da estação de monta de “verão” (OR = 8,4058; IC95%: 1,0377 - 68,0882; significativo). Brucelose, neosporose IBR, BVD e leptospirose causada por outras sorovariedades não influenciaram a taxa de concepção na época de reprodução, o que não exclui a possibilidade de distúrbios posteriores.

Palavras chave: bovinos, doenças infecciosas, reprodução

ASSOCIATION BETWEEN CONCEPTION AND REPRODUCTIVE INFECTIOUS DISEASES IN NELLORE MATRICES.

ABSTRACT: The present study aims to evaluate the influence of brucellosis, leptospirosis, infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine viral diarrhea (BVD) and neosporosis in the reproductive indicator most commonly used among Brazilian ranchers, the conception rate (or pregnancy rate) after breeding season. Two analytical epidemiological studies were made: a case control study using a sample of matrices of the herd that were submitted to the breeding season during the rainy season, and a retrospective cohort study using all heifers submitted to the breeding season during the dry season. The determination of pregnancy status was performed by rectal palpation between 60 and 90 days after the end of the breeding season. The antibody search was performed by the following methods: rose bengal test and complement fixation test for brucellosis; microscopic agglutination test for leptospirosis, virus neutralization for IBR and BVD, and indirect immunofluorescence assay for neosporosis. The statistical significance of association between the disease and failure in the conception was held by the methods of chi-square or Fisher's exact test ($p < 0,05$) and by the 95% confidence interval for the relative risk (RR) or odds ratio (OR). Associations with possible causal relationship were found between conception failure and: Infection considering any serovar of *Leptospira* spp. (titer ≥ 400) in primiparous (OR = 7.3636, 95% CI: 1.3373 to 40.5479; significant), all of which were infections caused by *L. Wolffi*; and infection by *L. Autmumnalis* (titer of ≥ 200) considering all the animals of the rainy breeding season (OR = 8.4058; IC95%: 1.0377 – 68.0882; significative). Brucellosis, IBR, BVD, neosporosis and leptospirosis caused by other serovars did not influence the rate of conception in the breeding season, which does not exclude the possibility of further disturbances.

Key words: cattle, infectious disease, breeding

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte tem grande importância econômica no Brasil. O nascimento de bezerros é fator limitante e desempenha papel importante no custo final de produção da carne. Diversos fatores prejudicam a natalidade em bovinos de corte. Entre os agentes infecciosos causadores de distúrbios reprodutivos, maior importância tem sido dada a *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. (diversas sorovariedades), Herpesvírus Bovino tipo 1, Vírus da Diarréia Vira Bovina e *Neospora caninum*.

Poucos estudos epidemiológicos analíticos têm sido realizados no principal bioma brasileiro que abriga fazendas de cria de gado de corte, o cerrado. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da brucelose, leptospirose, IBR, BVD e neosporose no indicador reprodutivo mais comumente usado entre os pecuaristas brasileiros, a taxa de concepção (ou prenhez).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização da pecuária de corte no Brasil e distúrbios reprodutivos relacionados

Nos últimos anos, o Brasil se tornou um dos maiores exportadores de carne bovina, com aproximadamente 20% do mercado mundial (DE ZEN & BARROS, 2010). A pecuária de corte brasileira gera cerca de 360 mil empregos diretos, mais de 1 milhão de empregos indiretos e movimenta mais de 10 bilhões de dólares por ano (DE ZEN & BARROS, 2010). O Brasil tem mais de 200 milhões de cabeças de bovinos e, apoiado no aumento da eficiência de produção, deverá apresentar crescimento constante nos próximos anos (PIRES et al., 2010).

O sistema extensivo responde por grande parte da produção de bovinos de corte no Brasil e se caracteriza pelo uso de pastagens como única fonte de alimentos, sendo suplementadas com formulações minerais (EUCLIDES FILHO & EUCLIDES, 2010). Os zebuínos (predominantemente o Nelore) e seus cruzamentos representam aproximadamente 80% do rebanho de corte brasileiro e se concentram nas regiões sudeste, centro-oeste, norte e nordeste (EUCLIDES FILHO & EUCLIDES, 2010), ou seja, o território brasileiro localizado na zona tropical. O cerrado é a região produtora de carne bovina mais importante do país (EUCLIDES FILHO & EUCLIDES, 2010).

Nas fazendas, a produção pecuária está condicionada ao retorno econômico que a atividade gera para o investidor. O produtor tem condições de controlar os custos, mas os preços são formados pelo equilíbrio entre a oferta e a demanda (DE ZEN & BARROS, 2010). A reprodução é o principal fator limitante na produção de carne (CALEGARE, ALBERTINI & LANNA, 2010). O bezerro é o insumo fundamental de maior custo num boi gordo terminado (DE ZEN & BARROS, 2010) e, havendo escassez de bezerros, esse custo pode se elevar consideravelmente. Logo, toda essa cadeia produtiva está apoiada na fase de cria, e um aumento na sua eficiência beneficia toda estrutura subsequente (EUCLIDES FILHO & EUCLIDES, 2010). No entanto, a cria se

constitui na atividade de menor rentabilidade e maior risco econômico na pecuária (EUCLIDES FILHO & EUCLIDES, 2010).

A produtividade da fase de cria poderia ser aumentada com o uso ou a intensificação de diversas tecnologias. Entretanto, essa intensificação é difícil sob o ponto de vista econômico, exatamente em virtude de sua eficiência biológica (CALEGARE, ALBERTINI & LANNA, 2010). A correta compreensão dos fatores que interferem no desempenho reprodutivo possibilita ao pecuarista adotar práticas de manejo que podem aumentar a lucratividade da produção de bezerros (HADAD & MENDES, 2010).

A baixa produtividade das pastagens, a baixa eficiência reprodutiva, a alta mortalidade e as baixas taxas de crescimento contribuem para produtividades muito baixas da vaca de corte nacional (CALEGARE, ALBERTINI & LANNA, 2010). A eficiência biológica de um rebanho de cria é dada pela somatória do peso dos bezerros desmamados dividida pelo número de vacas expostas à estação de monta. Nesse caso, a eficiência reprodutiva é fundamental, e o peso a desmama é geralmente um fator secundário, mas importante para índices de eficiência econômica (CALEGARE, ALBERTINI & LANNA, 2010). Do ponto de vista econômico, a fertilidade do rebanho também é o componente mais importante para o sucesso da produção de gado de corte na fase de cria, ou seja, o nascimento de bezerros é mais importante que o ganho de peso e a qualidade de carcaça obtida por esses (HADAD & MENDES, 2010). A baixa eficiência reprodutiva compromete a produtividade, uma vez que aumenta o período de serviço e o intervalo entre partos, reduz a vida útil da matriz, aumentando a taxa de descarte de animais e os custos de produção (PIRES et al., 2010).

A estação de monta é uma ferramenta zootécnica utilizada com o objetivo de fornecer condições especiais de alimentação, manejo e época de comercialização, para que as matrizes e suas futuras crias tenham o máximo desempenho (HADAD & MENDES, 2010). Em fazendas de cria extensiva de gado de corte, a implantação da estação de monta proporciona melhora substancial na lucratividade e na eficiência biológica do processo de produção (PIRES et al., 2010). A estação de monta facilita a obtenção de dados sobre a eficiência reprodutiva do rebanho e permite o descarte de

matrizes inférteis já na detecção da gestação, a partir de 25 dias após o fim da estação (HADAD & MENDES, 2010). A estação de monta é o período estabelecido para que se obtenha concepção das matrizes por meio da monta natural ou inseminação artificial (PIRES et al., 2010). A escolha da época da estação de monta deve levar em conta a sazonalidade na produção de forragens, determinada pelas condições climáticas da região (HADAD & MENDES, 2010).

O desempenho ideal da vaca de corte pressupõe a obtenção de um bezerro a cada ano (CALEGARE, ALBERTINI & LANNA, 2010). Para isso, a estação de monta definitivamente implantada não deve ultrapassar 90 dias (HADAD & MENDES, 2010). No entanto, zebuínos e raças adaptadas a regiões tropicais apresentam gestação mais longa e, criados extensivamente, podem apresentar maior período de anestro nutricional pós-parto, o que impõe o uso de estações de monta maiores (PIRES et al., 2010). Vacas que concebem no início da estação de monta parem mais cedo e terão mais tempo para conceber na próxima estação de monta (HADAD & MENDES, 2010). Para maximizar a produtividade do rebanho de cria, deve-se obter elevada taxa de concepção nos primeiros dias da estação de monta, para que essa dure o menor período possível, sem prejudicar a eficiência reprodutiva do rebanho (PIRES et al., 2010).

Os valores esperados de alguns indicadores reprodutivos encontram-se descritos no quadro 1.

Quadro 1: Parâmetros mínimos e altos de eficiência reprodutiva para rebanhos bovinos de corte em regime de criação extensiva.

Parâmetros	Eficiência Reprodutiva	
	Alta (%)	Mínima (%)
Concepção	92 a 96	85
Natalidade	85 a 90	83
Desmame	85	78
Aborto	1 a 2	1 a 2
Mortalidade pré-desmame	≤ 5	-

Adaptado de: JUNQUEIRA & ALFIERI (2006)

Diversos problemas podem interferir na taxa de concepção de vacas. Fatores ligados aos touros em estação de monta com múltiplos reprodutores, tais como: falta de

libido; má qualidade do ejaculado; relação touro/vaca inadequada; e distúrbios comportamentais de dominância entre touros (PIRES et al., 2010). Fatores ligados às matrizes, tais como: anestro; repetição de cio; retenção de placenta; infecções uterinas; doença cística ovariana (DCO); mortalidade embrionária; e aborto (PTASZYNSKA, 2007).

O anestro, a repetição de cio, a retenção de placenta, as DCOs, algumas infecções uterinas e todos os fatores ligados ao touro, exceto a qualidade do ejaculado, agem impossibilitando a monta. Esses fatores são provocados principalmente por déficit nutricional, distúrbios hormonais (principalmente pelo efeito da amamentação do bezerro, que coincide com a estação de monta) e falhas de manejo (CALEGARE, ALBERTINI & LANNA, 2010; HADAD & MENDES, 2010; PIRES et al., 2010).

Após a monta, as perdas reprodutivas se devem a falha na fecundação, perda embrionária e, posteriormente, aborto (THUN & JANETT, 2007). A falha na fecundação se deve a incapacidade dos espermatozoides de alcançar o ócito, por causas naturais ou falha nos procedimentos de inseminação artificial (THUN & JANETT, 2007). Em vacas, é geralmente aceito que a taxa de concepção é aproximadamente 90%, indicando que aproximadamente 10% das inseminações ou acasalamentos falham em fecundar o ócito (THUN & JANETT, 2007).

Após a concepção, as falhas reprodutivas são classificadas de acordo com o desenvolvimento do conceito. A classificação das falhas está descrita no quadro 2. Diversas causas infecciosas e não infecciosas de perda da gestação têm sido relatadas e encontram-se listadas no quadro 3:

Quadro 2: Denominação das falhas reprodutivas de bovinos de acordo com o período gestacional de ocorrência.

Falhas	Período
Mortalidade embrionária precoce	da concepção até o 14º dia de gestação
Mortalidade embrionária tardia	15º ao 46º dia de gestação
Aborto	47º ao 270º dia de gestação
Natimortalidade/Mortalidade perinatal	271º dia de gestação até 24h após o nascimento

Adaptado de: JUNQUEIRA & ALFIERI (2006)

Quadro 3: Causas de perdas reprodutivas em bovinos.

Causas não infecciosas	Causas infecciosas
Aberrações genéticas: Anormalidades cromossômicas, Fitoteratógenos Nutricional: Plantas tóxicas Envenenamento por nitrato Fito-estrógenos Deficiência de iodo Deficiência de vitamina A Deficiência de selênio Intoxicação por chumbo Intoxicação por cádmio Estresse: Manejo Alta temperatura ambiental Trauma Cirurgias Seca Ansiedade Vacinações Miscelâneas: Prenhez múltipla Inseminação Terapia com corticóides Tratamento com prostaglandinas Alergia Desidratação	Vírus: BoHV1 BoHV4 BVDV Vírus da para-influenza 3 Parvo vírus Bactéria: <i>Brucella abortus</i> <i>Campylobacter fetus</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Leptospira hardjo/pomona</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Mycoplasma spp.</i> <i>Staphylococci</i> , <i>Streptococci</i> <i>Salmonella dublin</i> <i>S. typhimurium</i> <i>Pasteurella spp.</i> , <i>E. coli etc.</i> Protozoários: <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Sarcocystis</i> <i>Neospora caninum</i> <i>Trichomonas fetus</i> Fungos: <i>Aspergillus spp.</i>

Adaptado de: PTASZYNSKA (2010)

As causas não infecciosas são normalmente multifatoriais, difíceis de diagnosticar e responsáveis por mais de 70% das perdas na gestação em vacas (THUN & JANETT, 2007). Dentre os agentes infecciosos causadores de distúrbios reprodutivos, maior importância têm sido dada a *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. (diversas sorovariedades), Herpesvírus Bovino tipo 1, Pestivírus Bovino biótipo 1 e *Neospora caninum* (PTASZYNSKA, 2007).

2.2. Brucelose bovina

A brucelose é uma doença subaguda ou crônica que pode afetar diversas espécies de animais, especialmente os domésticos, causada por bactérias do gênero

Brucella (CORBEL et al., 2006). As espécies de *Brucella* spp. apresentam predileção por hospedeiros, porém não são exclusivas. *Brucella abortus* é a espécie com maior distribuição pelo mundo e normalmente associada aos bovinos, no entanto esses podem se infectar com outras espécies de *Brucella* spp., assim como a *B. abortus* pode infectar outros hospedeiros (CORBEL et al., 2006). Dentro do gênero *Brucella*, são descritas 10 espécies (BANAI & CORBEL, 2010), sendo as três espécies principais, também denominadas clássicas, subdivididas em biovariedades: *B. abortus* com 7 biovariedades (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9); *B. melitensis* com 3 biovariedades; *B. suis* com 5 biovariedades (BRASIL, 2006).

As Brucelas são cocobacilos Gram-negativos, imóveis, intracelulares facultativos, e podem formar colônias em cultivos primários tanto com morfologia rugosa ou mucoide (*B. ovis* e *B. canis*) quanto lisa (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) (BRASIL, 2006). Essa morfologia colonial está relacionada à composição química do principal antígeno da parede celular e, nas espécies clássicas, está associada a características de virulência (BRASIL, 2006). Geneticamente essas bactérias podem ser consideradas como variantes de uma única espécie (*Brucella melitensis*, por razões históricas); no entanto, por motivos práticos, essa abordagem não é considerada (CORBEL et al., 2006).

A brucelose apresenta distribuição mundial, mas a maioria dos países europeus e outros grandes exportadores de carne, como Austrália, Canadá e Nova Zelândia, já se encontram livres dessa enfermidade, ou estão em fase de sê-lo, como Estados Unidos e Índia (OIE, 2012). A biovariedade1 de *B. abortus* é a mais predominante e universal, enquanto as outras biovariedades apresentam variações geográficas (ACHA & SZYFRES, 2001a). No Brasil, já foram identificadas *B. abortus* biovariedades 1, 2 e 3 e *B. suis* biovariedade1, *B. canis* e *B. ovis* infectando animais domésticos (BRASIL, 2006). *B. melitensis* não foi identificada no Brasil (BRASIL, 2006).

A prevalência de focos de brucelose por estado varia de 2,79% a 41,19% das propriedades com atividade reprodutiva de bovinos, enquanto a prevalência de animais sororreagentes por estado varia de 0,14% a 10,25%. As maiores prevalências foram

registradas no Mato Grosso (FERREIRA-NETO et al., 2011), estado que mantém um dos maiores rebanhos bovinos do Brasil.

A principal fonte de infecção dos bovinos são as vacas gestantes, que podem eliminar o agente através dos fetos, abortados ou nascidos, fluidos e envoltórios fetais, e descargas vaginais no puerpério (ACHA & SZYFRES, 2001a). *Brucella* spp. pode sobreviver longos períodos no ambiente, em poeira, esterco, água, lama, solo, produtos cárneos e lácteos, dependendo do número de organismos, temperatura, pH, radiação solar e presença de outros contaminantes microbianos (CORBEL et al., 2006). A estabulação contribui com a disseminação da doença pelo rebanho, e a prevalência em gado leiteiro é maior que em gado de corte (ACHA & SZYFRES, 2001a). A transmissão ocorre principalmente por ingestão direta, ao lamber a cria, ou indireta, por pasto e água contaminados; no entanto, ela também pode ocorrer por inalação, inoculação conjuntival, fômites e pela pele lesionada (CORBEL et al., 2006). Infecção intrauterina, por colostro e leite pode ocorrer, e estima-se que 5% das crias de vacas infectadas apresentem infecção latente até o primeiro aborto ou parto (CORBEL et al., 2006). A transmissão sexual não desempenha papel importante na brucelose bovina, porém o uso da inseminação artificial pode trazer riscos ao rebanho se não forem tomadas precauções quanto à sanidade do touro (ACHA & SZYFRES, 2001a). A transferência de embriões, realizada segundo os protocolos internacionalmente preconizados de lavagem e tratamento para a redução da transmissão de agentes infecciosos, não apresenta risco de transmissão de brucelose (BRASIL, 2006).

Vacinação, idade, sexo, tamanho e densidade do lote, e aspectos do manejo do rebanho influenciam na severidade da doença (CORBEL et al., 2006). Existe variação de susceptibilidade individual, pois alguns animais não são infectados mesmo em rebanhos com elevada taxa de prevalência (ACHA & SZYFRES, 2001a). Animais não vacinados e sexualmente maduros têm maior chance de abortar e secretam mais bactérias no ambiente, enquanto animais mais jovens são mais resistentes, mas podem desenvolver infecção latente, permanecendo soronegativos mesmo após o primeiro aborto ou parto (CORBEL et al., 2006).

Em bovinos, a fase inicial da infecção normalmente é inaparente. Após adentrar o organismo, as *B. abortus* se multiplicam nos linfonodos regionais e logo são conduzidas, livres ou dentro de macrófagos, por via hematogênica e/ou linfática, a diferentes órgãos (ACHA & SZYFRES, 2001a). Elas são capazes de resistir à destruição fagocitária, sobrevivendo e se multiplicando dentro dos macrófagos por longos períodos, sendo esse um importante mecanismo de fuga da ação do complemento e dos anticorpos aglutinantes (BRASIL, 2006). A bacteremia ocorre normalmente de forma intermitente e com curta duração e, devido ao tropismo pelo eritritol, as bactérias se alojam em tecidos e fluidos associados à gestação, ao sistema reprodutor, às glândulas mamárias e aos linfonodos que os drenam (CORBEL et al., 2006).

As vacas constituem a categoria mais susceptível à brucelose, principalmente as vacas em gestação (ACHA & SZYFRES, 2001a). Devido à concentração de eritritol na placenta e nos anexos fetais, a *B. abortus* se multiplica rapidamente nesses tecidos, provocando lesões inflamatório-necróticas que, apesar de raramente atingirem todos os placentônios, impedem a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, assim como provocam a infecção maciça do feto e, conseqüentemente, o principal sinal clínico da enfermidade, o aborto (BRASIL, 2006), que ocorre normalmente na segunda metade ou no terço final da gestação (ACHA & SZYFRES, 2001a; CORBEL et al., 2006; BRASIL, 2006). Após o abortamento ou a parição, a doença torna-se crônica e as bactérias se alojam nos linfonodos e nas glândulas mamárias até que o animal torne-se gestante novamente (ACHA & SZYFRES, 2001a). Com o desenvolvimento da imunidade celular após o primeiro aborto, a gravidade das lesões diminui, tornando o aborto infrequente, embora outras manifestações da doença, como a retenção de placenta e o nascimento de bezerros mortos ou fracos, possam acontecer (BRASIL, 2006).

Os touros também são susceptíveis, porém são mais resistentes que as fêmeas. A multiplicação de *B. abortus* no aparelho reprodutor do macho leva a sinais clínicos como orquite, epididimite e infertilidade (ACHA & SZYFRES, 2001a).

Os sinais clínicos não são patognomônicos e o diagnóstico definitivo depende de auxílio laboratorial (CORBEL et al., 2006).

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessa zoonose na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2004).

Os métodos diagnósticos previstos no PNCEBT são baseados na detecção de imunoglobulinas (Ig) no soro sanguíneo. A maioria das imunoglobulinas presentes no soro de bovinos é da classe G (IgG1 e IgG2), seguidas das classes M (IgM) e A (IgA) (BRASIL, 2006). A resposta sorológica pós-infecção ou vacinação ocorre de forma semelhante, com a produção inicial de IgM seguida de IgG1, a partir da primeira semana, e IgG2 e IgA, tardiamente e com títulos mais baixos (BRASIL, 2006). Enquanto em animais infectados os títulos de IgG tendem a aumentar, em bezerras vacinadas entre 3 e 8 meses de idade esses títulos tendem a desaparecer (ACHA & SZYFRES, 2001a).

O diagnóstico e o controle da brucelose bovina devem ser feitos com base no rebanho, pois alguns animais infectados podem apresentar longos períodos de incubação (CORBEL et al., 2006). Deve-se levar em consideração o histórico dos animais, os títulos e a sensibilidade dos métodos diagnósticos às diferentes classes de Ig (ACHA & SZYFRES, 2001a). A identificação de um ou mais animais infectados é suficiente para determinar que a doença esteja presente no rebanho.

A maioria dos programas de erradicação da brucelose, incluindo o PNCEBT, preconiza a utilização da vacinação de bezerras com a amostra B19 de *B. abortus*, consagrada por seu poder protetor (65 a 80%) durante toda a vida do animal e pronunciado efeito antiabortivo, que reduz drasticamente a disseminação da doença (ACHA & SZYFRES, 2001a). O antígeno imunodominante da *B. abortus* (incluindo a amostra B19), usado no diagnóstico sorológico da brucelose, é o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular externa, porém ele também apresenta reações cruzadas com outras bactérias Gram-negativas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli*

O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana* O:30 e *Vibrio cholerae*, principalmente (CORBEL et al., 2006).

O impacto da brucelose na reprodução de bovinos, além do seu caráter zoonótico, demonstra sua importância econômica e explica por que muitos países adotaram programas de erradicação. Em 1983, foi estimado que as perdas por brucelose bovina nos Estados Unidos fossem de 32 milhões de dólares, apesar de o programa americano ter sido iniciado há mais de 40 anos (BRASIL, 2006). Na América Latina, há estimativas de prejuízo causado pela brucelose bovina de U\$ 600 milhões por ano (ACHA & SZYFRES, 2001a). Estimativas mostram ser a brucelose responsável pela diminuição de 25% na produção de leite e de carne e pela redução de 15% na produção de bezerros (BRASIL, 2006).

2.3. Leptospirose bovina

A leptospirose é uma doença transmissível dos animais e humanos, causada pela infecção por qualquer membro patogênico do gênero *Lepstospira* (OIE, 2011a), pertencente à família Leptospiraceae, da ordem Spirochaetales (FAINE, 1993). Sorologicamente, estão classificadas em 4 espécies saprófitas e em 13 espécies patogênicas, com mais de 260 sorovariedades (ADLER & MOCTEZUMA, 2010) em 23 sorogrupos (OIE, 2011a). Geneticamente, as leptospirosas patogênicas estão distribuídas em 4 genoespécies (OIE, 2011a). A classificação sorológica e genética apresentam grandes discrepâncias, tanto que cepas pertencentes à mesma sorovariedade podem estar classificadas em grupos genéticos diferentes, e vice-versa (FAINE, 1993).

A sorovariedade é o “táxon” básico. O termo sorovariedade é descrito como uma leptospira cujo soro homólogo de coelho consegue aglutiná-la, sem aglutinar outras cepas (FAINE, 1993). A classificação em sorovariedades é baseada na expressão de epítomos de superfície no mosaico de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a especificidade dos epítomos depende da composição do açúcar e sua orientação (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

Cada sorovariedade está associada a diferentes níveis de severidade da doença (FAINE, 1993). As sorovariedades têm hospedeiros de predileção, mas cada espécie animal pode ser hospedeira de mais de uma sorovariedade (ACHA & SZYFRES, 2001b). Essa especificidade não é absoluta, podendo determinada sorovariedade ser isolada de várias espécies (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Algumas espécies animais são refratárias à infecção por determinadas sorovariedades (FAINE, 1993). Várias sorovariedades podem coexistir em uma mesma região, e infecções com mais de uma sorovariedade podem ocorrer (FAINE, 1993). Exemplificando: onde bovinos coexistem com roedores ou marsupiais, dividindo o habitat, cada espécie mantém as sorovariedades adaptadas a si, no entanto, infecções cruzadas ou acidentais ocorrem (FAINE, 1993).

As sorovariedades são agrupadas em sorogrupos, cujos membros apresentam reações cruzadas devido à existência de antígenos comuns, e não o fazem com membros de outro sorogrupo (FAINE, 1993). Epítomos específicos para sorovariedades podem ser subunidades de epítomos específicos para sorogrupos, por essa razão, a especificidade para sorovariedade de uma reação de aglutinação é relativa quando se estudam sorovariedades sorologicamente relacionadas, pois há reações cruzadas (FAINE, 1993).

As leptospiros apresentam grande variedade genética e química, no entanto, a morfologia de seus flagelos, presentes em ambas as extremidades, e sua estrutura celular são geralmente similares (FAINE, 1993). São bactérias móveis, finas e helicoidais, com extremidades em forma de gancho, têm comprimento entre 6 e 20 μm e largura de 0,1 μm (ACHA & SZYFRES, 2001b). Seu formato helicoidal forma uma onda de aproximadamente 0,5 μm (FAINE, 1993) e permite que atravessem filtros que outras bactérias não atravessam (ACHA & SZYFRES, 2001b). São aeróbios obrigatórios e apresentam crescimento em meios simples enriquecidos com vitaminas B1 e B12, gorduras ácidas de cadeia longa e sais de amônia (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Seu crescimento ótimo ocorre em condições aeróbias, com pH entre 7,2 e 7,6 e temperatura entre 28 e 30°C (FAINE, 1993). São bactérias Gram-negativas, mas são

facilmente identificadas sem coloração em microscópio de campo escuro (FAINE, 1993).

As leptospirosas são capazes de sobreviver por longos períodos em solos alcalinos, lama, pântanos, cursos de água, fluidos e tecidos de animais vivos ou mortos (FAINE, 1993). A temperatura média e a alta pluviosidade dos países tropicais são fatores favoráveis para as leptospirosas (ACHA & SZYFRES, 2001b). Evidências sugerem que leptospirosas patogênicas podem se multiplicar sob determinadas condições no ambiente e, até mesmo, transpor períodos de seca na solução coloidal de solos argilosos (FAINE, 1993). Cepas mantidas por longo tempo em culturas perdem características antigênicas e virulência, mas recuperam-nas rapidamente após infecção (FAINE, 1993). É possível que a passagem rápida de um animal a outro aumente a virulência da cepa (ACHA & SZYFRES, 2001b).

São muito suscetíveis a baixa umidade (principalmente), temperaturas maiores que 42 °C, pH menores que 6,8, condições anaeróbicas, detergentes e a maioria dos antibióticos, exceto o cloranfenicol (FAINE, 1993).

A leptospirose é a zoonose com maior distribuição pelo mundo, sendo encontrada em todos os continentes, exceto na Antártida (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Há sorovariedades universais, como Pomona, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Canicola, e outras que estão presentes somente em determinadas regiões (ACHA & SZYFRES, 2001b). Nas Américas, as sorovariedades mais isoladas de bovinos são Pomona, Hardjo e Grippotyphosa (ACHA & SZYFRES, 2001b). A importância econômica da leptospirose bovina inclui os custos diretos e indiretos de abortos, falhas reprodutivas, queda na produção leiteira e tratamento veterinário, além daqueles associados à vacinação, testes diagnósticos e barreiras sanitárias para comércio internacional (FAINE, 1993).

Evidências de infecção já foram encontradas em praticamente todas as espécies de mamíferos estudadas (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Herbívoros e animais cuja dieta produza urina alcalina são melhores disseminadores da doença, pois as leptospirosas não sobrevivem bem em urina ácida, mas permanecem viáveis em urina alcalina (FAINE, 1993). A excreção bacteriana na urina pode ser contínua ou

intermitente, e sua concentração pode chegar 10^8 leptospiras/mL (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

A transmissão direta ocorre quando sangue ou fluidos corpóreos de animais infectados passam diretamente a um animal susceptível, por via congênita, venérea ou amamentação (FAINE, 1993). O contato direto com portadores genitais da leptospirose é uma importante rota de transmissão entre animais, e desempenha importante papel na manutenção da leptospirose dentro de uma mesma espécie (FAINE, 1993).

A transmissão indireta ocorre quando o animal adquire a leptospirose do ambiente contaminado. As leptospiras entram no organismo por soluções de continuidade na pele e possivelmente através da pele integra encharcada, pela conjuntiva, pelas vias aéreas, pelo trato genital e pela placenta em qualquer fase da gestação (FAINE, 1993). A transmissão por leite e água contaminada ocorre obviamente por via oral, no entanto essa rota de infecção é discutível (FAINE, 1993). Os focinhos de bovinos são sujeitos a pequenos traumas pela vegetação, o que é uma porta de entrada ideal para leptospiras em lâminas de água e pastagens contaminadas (FAINE, 1993).

No organismo, elas se espalham por bacteremia e alojam-se primeiramente nos pulmões, fígado e baço, com um crescimento exponencial de aproximadamente 8 horas (FAINE, 1993). A bacteremia dura aproximadamente 7 dias, até serem removidas da circulação por opsonização e fagocitose (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A partir daí, a infecção crônica se inicia e dura por período variável, dependendo, entre outros fatores, da adaptação da sorovariedade ao hospedeiro (ACHA & SZYFRES, 2001b).

As leptospiras se alojam no epitélio dos túbulos proximais renais do hospedeiro, e esse portador renal desempenha papel importante para a persistência e a epidemiologia da doença (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Essa condição pode durar por toda a vida com sorovariedades bem adaptadas ao hospedeiro, e sempre ocorre após infecção sistêmica, seguida, ou não, de sinais clínicos (FAINE, 1993).

Portadores de várias espécies animais atuam como reservatórios, mantendo a infecção não só nos túbulos renais proximais dos rins como em outros órgãos e sistemas, tais como, sistema reprodutor, cérebro e câmara anterior dos olhos (FAINE,

1993). Roedores e marsupiais são reservatórios importantes da leptospirose, normalmente não apresentam sinais clínicos, mas mantêm leptospirosas em seus rins e excretam grande quantidade delas no ambiente (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

Em bovinos, infecções crônicas pela sorovariedade Hardjo podem permanecer no útero e nos ovidutos de fêmeas gestantes ou não (ACHA & SZYFRES, 2001b). No final da gestação, os fetos de ruminantes são imunologicamente competentes e capazes de responder à infecção congênita, mas, quando sobrevivem, parecem reagir como os adultos, tornando-se portadores e excretadores (FAINE, 1993).

A severidade da doença depende da dose infectante (principalmente), da virulência, da toxicidade e da taxa de crescimento da cepa envolvida, da idade e da condição imune do hospedeiro (FAINE, 1993). Bovinos de todas as idades são susceptíveis, embora a enfermidade curse de forma mais grave em animais mais jovens (ACHA & SZYFRES, 2001b). Em bovinos, a infecção pode causar uma enfermidade de curso agudo, subagudo ou permanecer clinicamente inaparente (ACHA & SZYFRES, 2001b), principalmente quando provocada por sorovariedades adaptadas ao hospedeiro; no entanto, infecção por outras sorovariedades pode causar manifestações graves (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Na natureza supõe-se que as doses infectantes sejam muito pequenas, resultando em longos períodos de incubação, que superam o período para o surgimento de imunidade e produzem infecções subclínicas ou muito brandas, clinicamente insignificantes, cuja importância principal é a imunidade residual que ela estimula (FAINE, 1993).

Embora os mecanismos e fatores de virulência ainda não sejam bem definidos, sabe-se que ocorrem lesões no endotélio de pequenos vasos que levam a isquemia localizada e necrose em diversos órgãos como rins, fígado, pulmões, músculos e placenta (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

A leptospirose aguda nos bovinos é caracterizada por febre, emaciação, perda do apetite, fraqueza, congestão dos capilares da conjuntiva, anemia e diarreia com duração média de 4 a 5 dias (FAINE, 1993). Casos mais graves podem ocorrer, com hemoglobinúria e hematúria (urina variando de vermelha a quase preta), icterícia e

encefalite, resultados da degeneração e falência de rins e fígado, que podem levar à morte (FAINE, 1993).

Em fêmeas, os sinais de leptospirose incluem infertilidade, aborto, natimortalidade, mumificação fetal, nascimento de bezerros fracos e agalactia (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Após o aborto ou a natimortalidade, a placenta fica edemaciada e alguns cotilédones encontram-se necróticos. Infertilidade pode ser uma sequela de leptospirose genital subaguda ou subclínica (FAINE, 1993). Leptospirose crônica deve ser considerada na ocorrência de aborto, natimorto, nascimento de bezerros fracos e/ou prematuros e infertilidade (OIE, 2011a).

Anticorpos antileptospira aparecem poucos dias após a infecção e persistem por semanas ou meses, e em alguns casos por anos (OIE, 2011a). A imunidade é mediada principalmente por anticorpos contra os antígenos LPS da membrana externa (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A resposta imunológica a infecção ou imunização com leptospirosas intactas induz a formação de imunoglobulinas de diferentes classes com especificidade e afinidade para diversos epítomos (FAINE, 1993), sendo restrita às sorovariedades antigenicamente relacionadas (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Ela é predominantemente humoral no homem e na maior parte dos animais; no entanto, em bovinos, ela parece ser dependente da liberação de interferon- γ ; logo, nem sempre altos títulos significam imunidade (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Em rebanhos não vacinados, a presença de anticorpos pode indicar infecção recente (FAINE, 1993).

O diagnóstico da leptospirose é difícil. Os sinais clínicos não são específicos nem patognomônicos (FAINE, 1993). O diagnóstico conclusivo de leptospirose depende de confirmação laboratorial (FAINE, 1993; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A soroaglutinação microscópica (SAM) utilizando antígenos vivos é o teste de pesquisa de anticorpos mais usado, sendo o teste de referência para validação de novos testes e trânsito internacional (OIE, 2011a).

O LPS é o principal, se não o único, tipo de antígeno envolvido em reações de aglutinação (FAINE, 1993). Anticorpos contra o LPS e outras estruturas da superfície provocam a destruição do envelope externo, gradual dissolução e perda da integridade das leptospirosas. A motilidade torna-se errática e as leptospirosas se aglutinam (FAINE,

1993). Essa aglutinação, quando ocorre em pelo menos metade das leptospiras do campo do microscópio, determina o resultado positivo na SAM.

Discordâncias quanto ao título significativo para diagnosticar leptospirose existem na literatura. Segundo ADLER e MOCTEZUMA (2010), em áreas endêmicas, o critério para considerar um resultado indicativo de leptospirose é usualmente aceito quando o título for maior que 400 para um teste único, em presença de sinais clínicos e histórico de contato compatível. Já FAINE (1993) considera a titulação maior que 800. Ambos concordam que um aumento de 4 vezes no título em amostras pareadas com intervalo de 5 a 10 dias é significativo. A OIE (2011a) recomenda o título mínimo aceitável de 100 na SAM, mas FAINE (1993) afirma que um título maior ou igual a 50 em pacientes com sintomas compatíveis, em áreas não endêmicas, indica leptospirose (FAINE, 1993).

Os métodos de investigação para animais crônicos e portadores são essencialmente aqueles utilizados na infecção aguda (FAINE, 1993). A pesquisa de anticorpos é o procedimento laboratorial mais usado para confirmar diagnóstico clínico, determinar prevalência em rebanhos e conduzir estudos epidemiológicos (OIE, 2011a).

Na SAM, anticorpos contra outras bactérias normalmente não apresentam reações cruzadas significantes com as leptospiras, embora ocorram reações cruzadas entre sorovariedades e sorogrupos (OIE, 2011a). Discordâncias quanto à sensibilidade do teste também são encontradas na literatura. ADLER e MOCTEZUMA (2010) afirmam que tanto a sensibilidade quanto a especificidade da SAM são bem altas, porém o Manual de Teste de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2011a) afirma que em infecções com sorovariedades bem adaptadas ao hospedeiro, como sorovariedade Hardjo em bovinos, quando se considera o título de 100 como significante, a sensibilidade do teste é apenas 41%, e aumenta para 67% quando se considera o título de 10. Para melhorar a sensibilidade, a SAM deve ser realizada utilizando-se antígenos representativos de todos os sorogrupos conhecidos que causam infecção na espécie estudada, ou pelo menos daqueles existentes na região onde o animal se encontra (OIE, 2011a).

A SAM tem limitações no diagnóstico de infecções individuais, abortos e identificação de portadores renais e/ou genitais (OIE, 2011a). Pequenas diluições de soros com alta titulação podem não aglutinar devido ao efeito pró-zona (FAINE, 1993). A SAM é bem específica para sorovariedade, pelo menos para sorogrupos, mas não consegue diferenciar anticorpos vacinais dos resultantes de infecção (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Animais vacinados apresentam anticorpos contra as sorovariedades existentes na vacina (OIE, 2011a).

A determinação da sorovariedade infectante também apresenta discordâncias na literatura. A OIE (2011a) afirma que um animal infectado por uma sorovariedade pode apresentar reações com outras sorovariedades, normalmente com título menor. No entanto, sorovariedades diferentes podem coexistir em uma região e provocar infecções simultâneas (FAINE, 1993). Além disso, FAINE (1993) afirma que o título máximo varia de acordo com a sorovariedade infectante ou presente na vacina: o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* pode produzir títulos de 20.000 a 30.000; enquanto a sorovariedade *Hardjo* produz títulos muito mais baixos, de 1.600 a 3.000. Ao estudar abortos causados por leptospiros é importante considerar a evolução da doença e a sorovariedade envolvida, por exemplo: a sorovariedade *Pomona* induz o aborto em vacas logo após a infecção, portanto, a titulação na SAM é alta; a sorovariedade *Hardjo*, em vacas, provoca abortos na fase crônica, portanto, a titulação na SAM é muito variável, podendo ser até mesmo negativa (OIE, 2011a).

Reações cruzadas ocorrem não só entre sorovariedades do mesmo sorogrupo, sendo que no início da infecção (2 a 3 semanas) também ocorrem entre sorovariedades de sorogrupos diferentes, podendo predominar o título de uma sorovariedade heteróloga (ACHA & SZYFRES, 2001b). Com o passar do tempo a titulação mais alta passa a ser da sorovariedade homóloga (ACHA & SZYFRES, 2001b). Os títulos de anticorpos caem após semanas ou meses da infecção, no entanto, podem persistir por anos ou até mesmo toda a vida do animal (FAINE, 1993). Títulos baixos podem significar anticorpos residuais de infecções passadas ou anticorpos de formação recente que ainda não alcançaram um título alto (ACHA & SZYFRES, 2001b). O título de anticorpos pode cair até níveis indetectáveis quando os animais tornam-se

cronicamente infectados, e animais infectados podem abortar ou ser portadores de infecção renal e/ou genital, mesmo apresentando títulos abaixo do mínimo aceitável de 100 na SAM (OIE, 2011a).

Embora a SAM não possa identificar definitivamente a sorovariedade envolvida em infecções individuais ou surtos, ela pode sugerir a sorovariedade infectante em estudos realizados em regiões onde a sorovariedade já foi isolada de animais infectados (OIE, 2011a).

2.4. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

A infecção pelo herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) acomete ruminantes e tem sido associada com diversas manifestações clínicas em bovinos que incluem rinotraqueíte infecciosa (IBR), vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortos e infecção generalizada em neonatos (FRANCO & ROEHE, 2007). Pode também causar conjuntivite com lacrimejamento intenso, enterite, mastite, queda da produção leiteira e, raramente, encefalite (MURPHY et al., 1999b).

O BoHV-1 é um vírus da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (NANDI et al., 2009). Seu genoma consiste em uma dupla fita de DNA que codifica cerca de 70 proteínas, sendo 33 delas estruturais (NANDI et al., 2009). Com base em características genômicas e antigênicas, o BoHV-1 subdivide-se em 3 genótipos: BoHV-1.1, que se refere às amostras clássicas do vírus geralmente associado à doença respiratória e aborto; BoHV-1.2a, que é o subtipo mais frequentemente isolado no Brasil e está associado a uma ampla variedade de manifestações clínicas e aborto; e o BoHV-1.2b, que é associado à doença respiratória leve IPV/IPB, não foi associado com abortos e é incomum no Brasil (FRANCO & ROEHE, 2007). Isolados dos diferentes subtipos apresentam extensa reatividade sorológica cruzada (FRANCO & ROEHE, 2007).

O BoHV-1 ocorre mundialmente, embora já tenha sido erradicado da Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Suíça e Noruega, e programas de controle já tenham sido adotados por vários outros países (OIE, 2011b). A prevalência em países europeus

varia de 20% a 80% dos rebanhos infectados (ALFIERI, ALFIERI & MÉDICI, 1998). No Brasil, o vírus apresenta ampla distribuição, com prevalência de infecções variando de 8% a 82% em várias regiões, e é provável que exista uma parcela muito pequena de rebanhos livres (FRANCO & ROEHE, 2007). Estima-se que a prevalência média da infecção dentro dos rebanhos brasileiros varie de 30% a 70% (FRANCO & ROEHE, 2007).

Após a entrada no organismo do hospedeiro, o vírus se multiplica, provocando inflamação e destruição das células da mucosa local e do sistema imune, favorecendo infecções bacterianas secundárias. A dispersão do vírus no organismo ocorre principalmente via sistema linfático, seguida de viremia associada a linfócitos (NANDI et al., 2009). Na porta de entrada, o vírus pode entrar nos axônios dos nervos locais e se dispersar via intra-axonial para os corpos neuronais dos gânglios locais, onde estabelecem o estado de latência (NANDI et al., 2009). IBR e IPV/IBP estabelecem latência preferencialmente nos gânglios trigêmeo e o sacroespinal, respectivamente (NANDI et al., 2009). Durante o período de latência, novos vírions não são produzidos, embora o DNA viral continue produzindo proteínas que previnam a apoptose das células ganglionares infectadas (NANDI et al., 2009).

De maneira geral, as infecções agudas por BoHV-1 apresentam sinais sistêmicos como febre, depressão, inapetência e redução da produção leiteira (OIE, 2011b). Nos sistemas atingidos, vias respiratórias superiores ou genitais externos, o processo inflamatório é intenso, as mucosas tornam-se hiperêmicas e apresentam lesões necrótico-pustulares que evoluem para úlceras hemorrágicas rasas com crostas diftéricas (MURPHY et al., 1999b). Inclusões virais típicas de herpesvírus podem ser encontradas no núcleo das células periféricas dos focos necróticos (MURPHY et al., 1999b).

As perdas reprodutivas pela infecção por BoHV-1 acontecem quando o vírus atinge o útero, o ovário, o embrião ou o feto via monta natural, inseminação artificial ou viremia, o que ocorre geralmente de 3 a 6 semanas pós-infecção (ALFIERI, ALFIERI & MÉDICI, 1998). No útero, ocorre endometrite necrosante, provocando infertilidade temporária (ALFIERI, ALFIERI & MÉDICI, 1998). Nos Ovários, ocorrem necrose e

hemorragias que atingem o corpo lúteo e reduzem a concentração plasmática de progesterona no sangue, impedindo a continuação da gestação (ALFIERI, ALFIERI & MÉDICI, 1998). Em embriões, a morte é provocada tanto pelo efeito citopático direto do vírus sobre as células embrionárias quanto por alterações fisiopatológicas no ambiente uterino incompatíveis com o desenvolvimento normal do embrião (ALFIERI, ALFIERI & MÉDICI, 1998). Lesões macroscópicas não são observadas em fetos abortados, mas a maioria dos tecidos e o fígado apresentam focos necróticos microscópicos (MURPHY et al., 1999b).

O BoHV-1 pode determinar mortalidade embrionária a partir do sétimo dia pós-fertilização, quando o embrião perde a zona pelúcida, até o nascimento de bezerros fracos; no entanto, a maior frequência de abortamento é notada a partir do quarto mês de gestação, pois a facilidade de se perceber o ocorrido é maior (ALFIERI, ALFIERI & MÉDICI, 1998).

Apesar das implicações reprodutivas causadas pelo BoHV-1, DEL FAVA et al. (2006) demonstraram ser possível que fêmeas não vacinadas e infectadas tivessem bons indicadores reprodutivos, desde que mantidas em regime de criação adequado, com bom escore de condição corporal e ganho de peso durante a estação de monta.

O período de incubação varia de 10 a 20 dias (NANDI et al., 2009). Embora a morbidade possa ser alta, a mortalidade é baixa e muitos casos ocorrem de forma subclínica e passam despercebidos pelos criadores (OIE, 2011b). Infecções bacterianas secundárias podem agravar os sintomas respiratórios e provocar mortalidades de até 10% (MURPHY et al., 1999b). A vacinação não previne a infecção dos animais por cepas de campo, embora reduza seus sinais clínicos (NANDI et al., 2009).

As principais formas de transmissão são: via contato direto com secreções nasais e oculares, aerossóis, sêmen, secreções genitais e fluidos e tecidos fetais de animais infectados; ou via indireta por fômites contaminados (NANDI et al., 2009). O BoHV-1 começa a ser liberado via secreção nasal de 5 a 14 dias pós-infecção (OIE, 2011b).

Em machos, pode haver redução da fertilidade associada à recusa a monta, devido à inflamação local e a anomalias morfológicas e funcionais dos espermatozoides (FRANCO & ROEHE, 2007). Touros infectados via prepucial começam a liberar vírus no sêmen de 2 a 7 dias pós-infecção e, apesar de o período de excreção ser muito variável, ele pode durar muitas semanas (NANDI et al., 2009). O sêmen é contaminado durante a ejaculação, e o vírus não é excretado de forma uniforme ou continua por machos infectados (FRANCO & ROEHE, 2007). Logo, nem todos os ejaculados de um touro portador terão vírus suficientes para infectar uma fêmea (FRANCO & ROEHE, 2007).

A dose infecciosa mínima necessária para infectar uma fêmea durante a cópula foi calculada em torno de 100 TCID₅₀ (FRANCO & ROEHE, 2007). ACKERMAN e WYLER (1984) demonstraram a soroconversão, após inoculação intravaginal de 10⁷ TCID₅₀ do BoHV-1 (2011b).

A concentração viral de excreção por diferentes vias está descrita no quadro 4.

Quadro 4: Concentração viral de excreção do BoHV1 por bovinos

Via de Eliminação	Concentração (TCID 50/mL ou g)
Fluidos nasais	a
Sêmen	
Lavado Prepucial	
Secreções Vaginais	
Fetos abortados	
Reexcreção (nasal e vaginal)	

Adaptado de: NANDI et al. (2009)

Manejos estressantes, terapias com corticoides e outras situações que possam causar baixa na função imunológica podem reiniciar o ciclo lítico viral e sua reexcreção, seguida ou não de sinais clínicos (NANDI et al., 2009).

Durante a reexcreção, esses títulos são consideravelmente mais baixos (NANDI et al., 2009). Animais previamente vacinados podem excretar vírus após infecção, mas com títulos menores e por períodos mais curtos (NANDI et al., 2009). Animais infectados com o subtipo 1.1 excretam de 10 a 100 vezes mais vírus e disseminam

melhor a doença no rebanho que animais infectados pelo subtipo 1.2b (NANDI et al., 2009).

O diagnóstico é presumido em achados clínicos, patológicos e epidemiológicos, porém só se torna definitivo com exames laboratoriais diretos ou indiretos. Como ocorre infecção latente, a detecção de imunoglobulinas anti-BoHV-1 é suficiente para determinar a condição de portador (OIE, 2011b). É importante ressaltar que esses testes não são capazes de diferenciar anticorpos contra BoHV-1 daqueles produzidos contra BoHV-5, causador de distúrbios nervosos em bovinos (FRANCO & ROEHE, 2007).

A infecção desencadeia respostas imunológicas, celular e humoral, de 7 a 14 dias pós-infecção, que duram por toda a vida do animal, embora o título de imunoglobulinas possa cair para abaixo do limite de identificação de alguns testes após alguns anos (OIE, 2011b). A imunidade passiva em bezerros dura de 3 a 9 meses; dessa forma, todo animal reagente em um teste de pesquisa de anticorpos deve ser considerado infectado se tiver mais de 9 meses e não for vacinado (OIE, 2011b).

2.5.Diarreia Viral Bovina

A diarreia viral bovina é uma doença infectocontagiosa viral que acomete ruminantes e suínos (OIE, 2011c). O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*, apresenta envelope lipídico cobrindo um capsídeo esférico, provavelmente icosaédrico, de aproximadamente 50 nm de diâmetro, e seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA de sentido positivo com aproximadamente 12,5 Kb, que é infecciosa (MURPHY et al., 1999a).

O vírus se subdivide em 2 genótipos principais (1 e 2) e 4 subgenótipos 1a, 1b, 2a e 2b, de acordo com suas características antigênicas e genéticas (RIDPATH & FLORES, 2007). A maioria das cepas de referência, vacinais e de baixa e moderada virulência, pertencem ao genótipo 1, enquanto o genótipo 2 geralmente está associado a surtos de infecções agudas severas e síndrome hemorrágica (RIDPATH & FLORES, 2007).

Ambos os genótipos podem ocorrer na forma citopatogênica (CP) ou não citopatogênica (NCP), de acordo com sua capacidade de induzir lise em cultivos celulares (OIE, 2011c). Os isolados NCP são responsáveis pela maioria das infecções naturais e pelas infecções fetais persistentes, enquanto isolados CP são uma minoria associada quase que exclusivamente à doença das mucosas (MD) (RIDPATH & FLORES, 2007).

O vírus entra na célula do hospedeiro por endocitose mediada por receptores, sua replicação ocorre no citoplasma através da tradução de uma única poliproteína, que posteriormente é clivada para formação de proteínas não estruturais e estruturais, que formarão novos vírus no retículo endoplasmático, que serão liberados para o meio extracelular por exocitose ou lise (MURPHY et al., 1999a).

O BVDV é pouco estável no ambiente e facilmente inativado por desinfetantes comuns e calor (MURPHY et al., 1999a).

BVDV ocorre mundialmente e é um patógeno importante com alta morbidade, que provoca mortalidade e perdas econômicas em gado de corte e leite (MURPHY et al., 1999a). Programas de erradicação nos países escandinavos obtiveram sucesso e foram seguidos por países como Alemanha, França, Estados Unidos e Rússia, no entanto o processo produtivo intensificado, a movimentação e o tamanho da população dificultam a erradicação nesses países (RIDPATH & FLORES, 2007).

No Brasil, diversos estudos demonstraram ampla distribuição do BVDV, com soropositividade variando de 18% a 84%, com aproximadamente dois terços das infecções sendo causadas pelo genótipo 1 (RIDPATH & FLORES, 2007).

O vírus se dissemina principalmente por contato direto entre animais, embora a transmissão vertical desempenhe importante papel na epidemiologia e na patogênese (OIE, 2011c). Ela também ocorre de forma indireta através de fômites e alimentos contaminados com secreções oronasais, urina, fezes e líquido amniótico de animais infectados (MURPHY et al., 1999a). A transmissão iatrogênica pode ocorrer por agulhas e materiais cirúrgicos, luvas de palpação, tatuadores, aplicadores de brinco e inseminação artificial com sêmen contaminado (RIDPATH & FLORES, 2007).

Embora a infecção seja mais comum em animais entre 8 e 24 meses de idade, os animais são susceptíveis à infecção em qualquer idade, tendo os anticorpos colostrais como protetor até 8 meses de idade (MURPHY et al., 1999a).

A infecção pelo BVDV provoca a diarreia viral bovina (BVD), em animais imunocompetentes, e a doença das mucosas (MD), em animais persistentemente infectados (PI), ambas com sintomatologia bem parecida, porém com gravidade e ocorrência bem diferentes (MURPHY et al., 1999a). As consequências e a severidade da infecção aguda pelo BVDV dependem da cepa viral, da competência imunológica do animal, do estado gestacional e da ocorrência de infecções secundárias (RIDPATH & FLORES, 2007).

Em animais não gestantes, a BVD geralmente é autolimitante, com morbidade alta e mortalidade muito baixa ou nula (RIDPATH & FLORES, 2007). A maior parte das infecções cursa com febre e leucopenia, embora possa haver também diarreia, descargas nasais e oculares, estomatite erosiva e queda na produção leiteira (MURPHY et al., 1999a). A infecção também causa imunossupressão, podendo ser acompanhada de infecções secundárias respiratórias e entéricas, principalmente em bezerros (MURPHY et al., 1999a). Pode ocorrer a BVD aguda hemorrágica, com febre, diarreia sanguinolenta, hemorragias e tempo de coagulação retardado, que pode levar a mortalidade de 22,4% em bezerros (RIDPATH & FLORES, 2007).

Touros podem sofrer queda temporária na fertilidade e excretar o vírus no sêmen (OIE, 2011c). Lesões inflamatórias (ooforite linfocítica) dentro do tecido ovariano foram demonstradas tanto nos folículos quanto nos corpos lúteos em formação de vacas infectadas e contribuíram claramente para os transtornos funcionais que levam à função folicular e luteínica inadequadas e, conseqüentemente, infertilidade (PTASZYNSKA, 2007).

Quando a BVD ocorre em fêmeas gestantes, as consequências variam de acordo com a fase de desenvolvimento fetal e o biótipo viral envolvido (RIDPATH & FLORES, 2007). Apesar de a infecção congênita geralmente levar à morte embrionária e ao aborto, estes nem sempre são reconhecidos no campo, pois se o feto ainda é muito pequeno, a vaca simplesmente retorna ao cio (OIE, 2011c). Em geral, abortos em

qualquer fase da gestação podem ser atribuídos ao BVDV (RIDPATH & FLORES, 2007).

Até 80 dias de gestação, ocorre morte embrionária e reabsorção fetal (MURPHY et al., 1999a). Oócitos sem a zona pelúcida intacta se mostraram susceptíveis a infecção *in vitro* (OIE, 2011c).

De 80 a 125 dias de gestação, podem ocorrer efeitos teratogênicos ligados à organogênese, principalmente nos olhos e no sistema nervoso, aborto, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos ou aparentemente normais (MURPHY et al., 1999a). Quando uma cepa NCP infecta o feto, pode ocorrer uma infecção persistente (OIE, 2011c). Os fetos nesse período ainda não desenvolveram completamente seu sistema imunológico, portanto desenvolvem uma imunotolerância ao vírus e excretam grande quantidade de vírus durante toda a vida, permanecendo negativos às pesquisas de anticorpos (MURPHY et al., 1999a).

A maioria dos animais PI morre nos primeiros meses de vida, alguns apresentam crescimento retardado e são mais susceptíveis a infecções secundárias; no entanto, alguns podem viver até 2 anos ou mais (RIDPATH & FLORES, 2007). Bezerras nascidas de vacas PI também são PI e perpetuam a infecção no rebanho por gerações (OIE, 2011c). Devido à excreção vitalícia com grande concentração viral, os animais PI disseminam a infecção pelo rebanho com maior facilidade do que animais com infecção aguda. Isso, somado à dificuldade de detectá-los por pesquisas de anticorpos, os torna os principais mantenedores da infecção na propriedade (MURPHY et al., 1999a). Estima-se que aproximadamente 1% a 2% dos animais de uma população sejam PI, com muitos desses sobrevivendo até a puberdade, podendo virar reprodutores (OIE, 2011c).

Touros PI normalmente têm fertilidade reduzida e excretam grande quantidade de vírus no sêmen (OIE, 2011c). Embora rara, a infecção ou mesmo a vacinação com vírus atenuado de touros na puberdade pode levar à infecção persistente dos testículos, apesar de esses animais apresentarem altos títulos de anticorpos anti-BVDV (OIE, 2011c).

Após 125 dias de gestação, o sistema imunológico do feto torna-se competente, portanto os bezerros desenvolvem anticorpos neutralizantes, debelam a infecção e nascem normalmente, podendo ou não apresentar sinais de danos patológicos (MURPHY et al., 1999a).

A MD é invariavelmente fatal e ocorre somente em animais PI, principalmente entre 6 meses e 2 anos de idade, quando esses são infectados por um biótipo CP (RIDPATH & FLORES, 2007). Apresenta a mesma sintomatologia da BVD, porém com severidade muito maior, causando emaciação, desidratação e morte em poucas semanas (MURPHY et al., 1999a). A MD está associada com a presença de biótipos CP que podem surgir de uma alta dose infectante, recombinação entre cepas NCP ou mutação do biótipo persistente (OIE, 2011c). A letalidade é próxima de 100%, porém a morbidade é baixa, dependendo da quantidade de animais PI no rebanho (RIDPATH & FLORES, 2007).

A principal forma de introdução da infecção em um rebanho é por meio de animais infectados (na fase aguda ou persistente) (RIDPATH & FLORES, 2007). Animais sendo comercializados devem ser testados para a ausência de infecção persistente. Geralmente se considera que animais sorologicamente positivos e não virêmicos são seguros, desde que não estejam prenhes (OIE, 2011c).

A importância da BVD e os prejuízos por ela causados dependem da condição do rebanho: a introdução de animais susceptíveis, principalmente novilhas, em rebanhos com infecção endêmica resulta em perdas esporádicas, enquanto a introdução de um animal PI em rebanho livre da infecção resulta em perdas dramáticas (MURPHY et al., 1999a). O controle da BVD se baseia na prevenção da ocorrência de animais PI no rebanho, utilizando pesquisas de anticorpos seguidas de isolamento viral ou identificação de material genético nos animais negativos (MURPHY et al., 1999a). Para muitos rebanhos, a vacinação resta como alternativa, embora as inativadas sejam pouco eficientes e as atenuadas possam provocar surtos de MD em animais PI (MURPHY et al., 1999a). As vacinas contra BVDV corretamente utilizadas conferem proteção razoável contra a doença clínica, porém são pouco eficientes para induzir proteção fetal (RIDPATH & FLORES, 2007).

2.6. Neosporose

Neosporose é uma doença causada pelo protozoário do filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, família Sarcocystidae, *Neospora caninum* (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). A infecção por *N. caninum* em bovinos tem sido reconhecida em todo mundo e é atualmente aceita como importante causa de abortamento em bovinos de corte e leite, sendo a principal etiologia em países como México, Dinamarca, Reino Unido, Suécia, Irlanda, Estados Unidos da América, Holanda e Nova Zelândia (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). Os prejuízos econômicos associados à infecção por *N. caninum* incluem natimortos e mortalidade neonatal, morte fetal prematura, que pode se apresentar como um retorno ao cio e/ou maior intervalo entre partos, mais descarte, menor produção de leite e menor valor do plantel reprodutor (PTASZYNSKA, 2007).

Estudos sorológicos demonstraram que a neosporose encontra-se disseminada por rebanhos bovinos por todo o mundo; no entanto, sua prevalência apresenta grande variação entre países, variando entre 16 e 80% na Europa (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Não há um estudo sistemático de prevalência da doença no Brasil. GUIMARÃES-JUNIOR e ROMANELLI (2006) citam prevalências em vacas leiteiras de aproximadamente 11% no Paraná e no Rio Grande do Sul, 14% na Bahia e 35% em São Paulo. Também citam prevalência de aproximadamente 20% em animais de corte em São Paulo.

N. caninum é um parasita intracelular obrigatório, com ciclo de vida heteróximo com 3 diferentes estágios infectantes: taquizóito, bradizóito e esporozoóito (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Os taquizóitos têm formato ovoide, lunar ou globular, com dimensões de 3 a 7 µm de comprimento por 1 a 5 µm de largura, conforme o estágio de divisão, e se multiplicam por endodiogenia (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). São encontrados em células do sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio dos túbulos renais e hepatócitos (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). Eles se espalham pelo organismo por via hematogênica (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Penetram ativamente nas células

hospedeiras, sendo encontrados no citoplasma da célula, dentro ou fora de vacúolo parasitóforo (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

Bradizoítos são delgados, têm de 6 a 8µm de comprimento, de 1 a 2µm de largura e se reproduzem assexuadamente, de maneira mais lenta, nos tecidos dos hospedeiros, podendo causar cistos no tecido intracelular (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). A parede do cisto é lisa, medindo até 4µm de espessura, dependendo do tempo de infecção (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006), e protege seu conteúdo de reações imunológicas, físicas e químicas, e permite que os bradizoítos transponham a barreira ácida digestiva do estômago dos hospedeiros definitivos e sejam liberados no intestino (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Os esporozoítos encontram-se no interior dos oocistos (fruto de reprodução sexuada), que estão presentes nas fezes dos hospedeiros definitivos (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Os oocistos medem de 10 a 11 µm de diâmetro, contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um, esporulando no ambiente em 24 horas (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

O cachorro e o coioite foram identificados como hospedeiros definitivos do *Neospora caninum*, enquanto uma forma clínica de neosporose foi descrita em bovinos, caprinos, ovinos, cervídeos e equinos (PTASZYNSKA, 2007). Cães e coioites se infectam ingerindo tecidos de bovinos e de outras espécies que contenham cistos, além da ingestão de oocistos esporulados livres no ambiente (transmissão horizontal) (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

A presença de anticorpos específicos em inúmeras espécies foi demonstrada, mas as consequências da soropositividade continuam incertas em muitas delas: lobos, raposas, quatis, cachorros-do-mato, lincês, chitas, gatos-mouriscos, lhamas, alpacas, antílopes e bisões-europeus (PTASZYNSKA, 2007).

Os bovinos parecem ser o hospedeiro intermediário mais importante (PTASZYNSKA, 2007). Há 2 formas de transmissão da neosporose para bovinos. A transmissão vertical ou transplacentária é a forma mais frequente de infecção de bovinos por *N. caninum*, sendo uma importante forma de manutenção do agente nos rebanhos (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). Ela ocorre devido à diminuição

da imunidade mediada por células na fêmea gestante, com reativação dos bradizoítos seguida de parasitemia (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Outros fatores causadores de imunossupressão, como a BVDV, também podem causar reativação da infecção latente (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). A reativação da infecção no terceiro trimestre da gestação está associada à transmissão vertical (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Esta modalidade de transmissão pode ocorrer por várias gestações (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). A taxa de infecção congênita varia de 66% a 95%, mas diminui conforme aumenta o número de gestações (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Devido ao fato de a infecção fetal frequentemente não resultar em abortamento, fêmeas podem nascer infectadas congenitamente e transmitir o agente para seus descendentes em futuras gestações (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). As novilhas resultantes podem abortar quando elas próprias ficarem gestantes (PTASZYNSKA, 2007). Menos de 5% dos animais podem repetir o aborto devido à neosporose (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). As matrizes que abortam um feto infectado por *N. caninum* podem ter fetos infectados em gestações posteriores (PTASZYNSKA, 2007). Infecção e abortamento ocorrem em gestações consecutivas ou não (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

A segunda forma de transmissão (horizontal) ocorre quando o bovino ingere alimentos ou água contaminados com oocistos de *N. caninum*, liberados pelo hospedeiro definitivo (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Especula-se a transmissão horizontal pela ingestão de leite e anexos fetais contendo taquizoítos e pela via venérea; no entanto, se possíveis, essas rotas não desempenham papel importante na transmissão da doença (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Apesar da eficiência da transmissão vertical e de sua importância na manutenção da doença no rebanho, a transmissão horizontal também desempenha papel importante na epidemiologia da doença, pois é responsável pelo aumento da prevalência em animais mais velhos e está associada a inúmeros surtos de aborto (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Dentre os fatores de risco para soropositividade em bovinos, podem-se citar: a presença e/ou a introdução de cães na propriedade; mais idade (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007); alta densidade populacional de cães na região (CONRATHS et al., 2007); alta densidade populacional de bovinos na propriedade; manutenção de animais em um único pasto, permitindo parições e grande concentração de bovinos; e novilhas para reposição criadas na propriedade (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

Em animais adultos, a perda reprodutiva é o único sinal clínico (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). A infecção congênita pode causar reabsorção fetal, mumificação, aborto, parto prematuro, natimortalidade e efeitos teratogênicos; no entanto, muitos fetos nascem congenitamente infectados, mas clinicamente sadios (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Os sinais clínicos em neonatos são: membros posteriores e/ou anteriores flexionados ou hiperestendidos, ataxia, diminuição do reflexo patelar, perda de consciência, exoftalmia, assimetria ocular e deformidades associadas com lesões de células nervosas, na fase embrionária (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). Bezerros podem nascer com distúrbios neurológicos ou desenvolvê-los alguns dias após o nascimento, e é provável que a maioria dos bezerros com neosporose clínica morram dentro das primeiras quatro semanas de vida (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

O aborto é o principal sinal clínico em bovinos (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). As matrizes podem abortar a partir do terceiro mês de gestação, mas a maioria ocorre no terço médio da gestação (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). Os rebanhos infectados com *N. caninum* podem apresentar padrões endêmicos e epidêmicos de aborto (PTASZYNSKA, 2007). Em alguns surtos em rebanhos leiteiros, 33% das fêmeas abortaram em poucos meses (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

A consequência da infecção em vacas gestantes depende de vários fatores, inclusive da idade do feto no momento da infecção e da condição imunológica da matriz (PTASZYNSKA, 2007). Em vacas que abortam, o pico de concentração de anticorpos evidencia que a reativação da infecção ocorre no meio da gestação (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Os fetos abortados geralmente são autolisados, sem nenhuma lesão macroscópica, e a placenta não fica retida (PTASZYNSKA, 2007). O *N. caninum*

é encontrado na maioria das vezes em cérebro, fígado e coração e raramente em outros órgãos, inclusive a placenta (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). A lesão mais característica é a encefalite focal, caracterizada por necrose e inflamação não supurativa (PTASZYNSKA, 2007). Aqueles que morrem nos estágios iniciais da gestação são reabsorvidos e provocam repetição do cio (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Fetos mumificados normalmente morrem antes dos 5 meses de gestação, e podem permanecer no útero por vários meses (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Não há teste padrão (“gold standard”) para neosporose (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). O diagnóstico é primariamente baseado no exame do feto abortado e secundariamente no exame da matriz (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Pode ser feito por histopatologia e imuno-histoquímica dos fetos abortados e sorologia da matriz ou do feto (reação de imunofluorescência indireta - RIFI, ensaio de imunoabsorção ligado à enzima - ELISA - e testes de aglutinação direta) (PTASZYNSKA, 2007).

RIFI e ELISA são os testes mais usados (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). É importante ter em mente que o treinamento e a experiência do leitor, os reagentes e o protocolo utilizados afetam os resultados da RIFI; logo, cada laboratório deve estabelecer seus próprios pontos de corte, e titulações fornecidas por diferentes laboratórios não podem ser comparadas diretamente (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

A demonstração de anticorpos específicos contra o parasita em um feto abortado, natimorto ou bezerro recém-nascido doente não permite uma conclusão definitiva ou inequívoca de que o parasita foi responsável pela doença (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). Logo após o aborto, vacas infectadas costumam ter títulos altos de anticorpos contra *N. caninum* (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007). Os títulos declinam rapidamente após o abortamento, mas baixos títulos positivos persistem por um tempo prolongado (GUIMARÃES-JUNIOR & ROMANELLI, 2006). A presença de anticorpos na matriz não indica que o aborto ocorreu por *N. caninum*, pois animais cronicamente infectados são positivos (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Outras causas, infecciosas ou não, devem ser excluídas, embora possam ocorrer infecções mistas com outros agentes (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

Se o estado de infecção de uma vaca precisa ser determinado, por exemplo, por razões comerciais, mas não relacionadas com um aborto, é importante notar que os anticorpos em bovinos infectados podem variar substancialmente e podem até cair abaixo do valor de corte do teste (CONRATHS & GOTTSTEIN, 2007).

2.7. Impacto na reprodução

Na Inglaterra e no País de Gales, DAVISON, OTTER E TREES (1999) avaliaram a associação da ocorrência de abortos com a soropositividade para BVDV, BoHV, *N. caninum* e *Leptospira* Hardjo. Apenas a infecção por *N. caninum* apresentou associação significativa (OR= 3,49; IC95% 2,16 - 5,69)

Na Califórnia, MUÑOS-ZANZI et al. (2004) avaliaram a associação de infecções por *N. caninum* (congenita e pós-natal), BVDV tipo 1, BVDV tipo2 e *Leptospira* spp.(sorovariedades Hardjo e Pomona) com diversos indicadores reprodutivos na primeira cria. Os resultados obtidos variaram muito, mas permitiram aos autores concluir (IC90%) que o efeito da BVD subclínica na fertilidade das novilhas dependeu de uma complexa relação entre múltiplas infecções pelo BVDV, que depende do tipo viral e da ocasião em que a infecção ocorreu em relação ao desenvolvimento reprodutivo da novilha e ao manejo. Eles concluíram também que a infecção por *N. caninum* está associada ao aumento de serviços por gestação e que a infecção por *L. interrogans* está associada a um atraso na primeira cria.

No oeste do Canadá, WALDNER (2005) avaliou a associação de falhas reprodutivas com a soropositividade ao BoHV1, BVDV tipo 1, BVDV tipo 2 e *N. caninum*. As variáveis reprodutivas avaliadas foram concepção, ocorrência de aborto e ocorrência de natimortalidade. A soropositividade para *N. caninum* foi associada ao aumento no risco individual de não gestação (OR=1,9; IC95% 1,2–2,9) e aborto (OR=2,8; IC95% 1,1–7,5). No momento da palpação, a proporção de animais com título ≥ 3.000 contra *N. caninum* no rebanho foi associada ao risco de aborto (OR=2,3; IC95%

1,5–3,5). Não houve mais associações significativas entre o estado sorológico e o reprodutivo dos animais.

Na Costa Rica, ROMERO et al. (2005) avaliaram os efeitos da neosporose sobre o intervalo entre partos, o intervalo entre parto e concepção, e o número de serviços por concepção. Não foram encontradas associações consistentes entre o estado sorológico e os indicadores reprodutivos estudados. Os autores concluíram que *N. caninum* não teve efeito sobre a reprodução.

Na Croácia, BIUK-RUDAN et al. (1999) avaliaram a associação do histórico de falhas reprodutivas com a soropositividade ao BoHV-1 e ao BVDV. Na análise estatística, os problemas reprodutivos foram considerados em conjunto, embora os mais frequentes fossem: repetição de cio (33%), retenção de placenta (22%), anestro (17%) e natimortalidade (11%). A prevalência de animais soropositivos para IBR e BVD, simultaneamente, foi significativamente maior em animais com histórico de problemas reprodutivos ($p \leq 0,01$). Os resultados permitiram aos autores concluir que a interação entre IBR e BVD aumenta a ocorrência de distúrbios reprodutivos, o que justifica a adoção de medidas de erradicação no plantel.

No Rio Grande do Sul, CORBELLINI et al. (2002) avaliaram a associação de ocorrência de aborto e a soropositividade para *N. caninum*. A ocorrência de aborto foi associada à soropositividade a neosporose (OR=3,33; IC 95%; 1,38-8,062). Com base nesses dados e achados necroscópicos em fetos abortados, os autores concluíram que *N. caninum* é uma importante causa de aborto em gado leiteiro na região.

No pantanal sul-mato-grossense, ANDREOTTI et al. (2010) avaliaram a associação da soropositividade para *N. caninum* com a concepção, a ocorrência de aborto e a natalidade. Foi encontrada associação significativa ($p < 0,0001$) entre a soropositividade para *N. caninum* e todas as variáveis reprodutivas estudadas. Com base nos resultados, os autores concluíram que a neosporose causa um impacto significativo na reprodução de novilhas na região, e que medidas de controle de entrada de animais e descarte dos reagentes deveriam ser tomadas.

No oeste do Estado de São Paulo, JUNQUEIRA et al. (2006) avaliaram o desempenho reprodutivo e a soroprevalência de um rebanho bovino de corte, criado

extensivamente, naturalmente infectado por BoHV1, BVDV e *Leptospira* Hardjo. A taxa de concepção obtida foi alta para todas as categorias (aproximadamente 90%), no entanto, nasceram menos bezerros do que o esperado, revelando uma alta taxa de abortamento (29,1% para novilhas, 12,7% para primíparas, 15,4% para vacas e 16,8% no total). Outros parâmetros reprodutivos também foram avaliados e considerados insatisfatórios pelos autores. Apenas por obterem prevalências altas (68,3% e 78,8%, para BoHV-1 e *L. Hardjo*, respectivamente), esses autores consideraram prováveis a participação do BoHV-1 e da *L. Hardjo* no baixo desempenho reprodutivo do rebanho. Por apresentar prevalência muito próxima de 100%, a BVDV (98%) não foi considerada prejudicial à reprodução.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Rebanho

O trabalho foi realizado no Município de Cassilândia/MS, em uma propriedade de gado de corte (ciclo completo) com 1.400 fêmeas aneloradas de cria com idade superior a 24 meses (na data da colheita das amostras) e submetidas à estação de monta de “verão”, entre novembro de 2009 e abril de 2010. As novilhas foram submetidas à estação de monta mais curta, entre dezembro de 2009 e março de 2010. Houve também uma estação de monta de “inverno”, iniciada em abril e terminada em junho de 2010, para novilhas pré-púberes ao início da estação de monta de “verão”, conforme manejo adotado pelo proprietário. Durante a estação de monta, essas fêmeas permaneceram em pastos formados principalmente por forrageiras do gênero *Brachiaria* e receberam suplementação mineral comercial com 65g/Kg de fósforo. Foi usada a monta natural com vários touros por lote.

O manejo sanitário da fazenda incluía vacinação de fêmeas com idade entre 3 e 8 meses contra brucelose e vacinação contra febre aftosa, conforme recomendação do MAPA, clostridioses e vermifugação de todos os animais. Os animais oriundos de compra, somente touros, tinham atestado sanitário para brucelose e tuberculose.

3.2. Formação dos grupos amostrais

Entre 60 e 90 dias do final da estação de monta, foi realizado o diagnóstico de gestação por palpação retal, e todas as matrizes não gestantes formaram o grupo caso. O grupo controle foi formado utilizando-se outras matrizes do mesmo lote, da mesma raça, com escore de condição corporal semelhante e mesma categoria animal, porém com gestação positiva.

Nos lotes submetidos à estação de monta durante o período chuvoso, o grupo controle foi formado pela mesma quantidade de animais do mesmo lote, caracterizando,

assim, um estudo do tipo caso-controle, cuja medida de associação de risco é estimada pela odds ratio (OR).

No lote de novilhas submetidas à estação de monta durante o período seco, o grupo controle foi formado por todos os outros animais do lote, caracterizando, assim, um estudo de coortes retrospectivo, cuja medida de associação de risco é calculada como risco relativo (RR). Esse lote teve de ser analisado dessa forma, pois apresentou taxa de concepção menor que 50%, portanto, a OR não se aproximaria do RR. A baixa taxa de concepção na estação de monta de “inverno” ocorre devido ao fato de ela ser um teste de precocidade sexual para as novilhas. Para obter sucesso, as matrizes utilizadas nesse lote devem ter atingido a puberdade e serem capazes de manter o balanço energético positivo para crescer e reproduzir durante um período em que a disponibilidade e a qualidade de alimento é limitada pelo ambiente.

Em ambas as estações, foram desconsiderados: animais com idade inferior a 24 meses na data da coleta de sangue, pois animais mais novos podem ser sororreagentes para brucelose, devido à vacinação; animais oriundos de cruzamento industrial, por serem poucos e pela dificuldade de obtenção de um controle; e animais mal identificados e/ou sem histórico recente, por não se ter certeza de que os mesmo foram submetidos à estação de monta.

As categorias utilizadas foram:

- Novilhas – fêmeas nulíparas submetidas à primeira estação de monta no período chuvoso.
- Primíparas – fêmeas com aproximadamente 36 meses de idade, que pariram apenas 1 bezerro e foram submetidas à segunda estação de monta no período chuvoso.
- Vacas – fêmeas que pariram 2 ou mais bezerros e foram submetidas à estação de monta no período chuvoso.
- Novilhas da estação de “inverno” - fêmeas nulíparas submetidas à primeira estação de monta no período seco.

3.3.Coleta de amostras

Durante o manejo de diagnóstico de gestação, foram coletadas amostras de sangue por punção da veia caudal mediana, utilizando tubos tipo “vacutainer” de 10 mL, devidamente esterilizados e identificados. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até ocorrer coagulação e depois mantidas sob refrigeração até a retração do coágulo. As alíquotas de soro obtidas foram transferidas para tubos de polipropileno com capacidade de 2,0 mL (eppendorfs), devidamente identificadas e conduzidas, sob refrigeração, até o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV/UNESP-Jaboticabal. As amostras permaneceram congeladas (-20°C) até o momento da realização dos exames.

3.4.Exames laboratoriais

Os diagnósticos de brucelose e leptospirose foram realizados no laboratório de bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV/UNESP-Jaboticabal. Os diagnósticos de IBR e BVD foram realizados no laboratório de viroses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV/UNESP-Jaboticabal. O diagnóstico de neosporose foi realizado no laboratório de parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

3.4.1.Brucelose

Conforme preconizado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006), do MAPA, foi utilizado o teste de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT), como triagem, em todas as amostras. Os resultados positivos foram confirmados e titulados pela reação de fixação do complemento (RFC).

3.4.1.1.AAT

O antígeno empregado nessa técnica foi um preparado comercial com a amostra 1119/3 de *B. abortus*, corado com rosa de Bengala, na concentração de 8,0% de volume celular, pH 3,63.

3.4.1.2.RFC

Conforme recomendado por ALTON et al. (1988), foi utilizado o antígeno comercial de *B. abortus* empregado na prova de soroaglutinação lenta em tubos, como complemento foi usado soro de cobaia, e o sistema hemolítico foi formado por hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo de coelho contra hemácia de ovino). Foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988). O ponto de corte utilizado foi a titulação 1:4.

3.4.2 Leptospirose

Conforme preconizado por FAINE (1993), a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. foi testada pela técnica da soroaglutinação microscópica (SAM). As placas com os soros diluídos e os antígenos foram incubadas em estufa bacteriológica BOD à temperatura de 28°C por meia hora e a leitura realizada em microscopia de campo escuro, diretamente na placa, com aumento de 100 vezes. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi a aglutinação de pelo menos 50% das leptospiros no campo microscópico. O título foi dado como a recíproca da maior diluição reagente. Devido às discordâncias e imprecisões da literatura científica, a análise estatística foi feita utilizando 4 pontos de corte diferentes: 100, 200, 400 e 800.

Os sorogrupos e as sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizados como antígenos estão apresentados no quadro 5.

Quadro 5: Sorogrupos e sorovariedades dos antígenos utilizados na soroaglutinação microscópica.

Sorogrupos	Sorovariedades
<i>Australis</i>	Australis
<i>Australis</i>	Bratislava
<i>Autumnalis</i>	Autumnalis
<i>Autumnalis</i>	Butembo
<i>Ballum</i>	Castellonis
<i>Bataviae</i>	Bataviae
<i>Canicola</i>	Canicola
<i>Celledoni</i>	Whitcombi
<i>Cynopteri</i>	Cynopteri
<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa
<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae
<i>Javanica</i>	Javanica
<i>Panamá</i>	Panama
<i>Pomona</i>	Pomona
<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes
<i>Sejroe</i>	Hardjo
<i>Sejroe</i>	Wolffi
<i>Shermani</i>	Shermani
<i>Tarassovi</i>	Tarassovi
<i>Andamana</i>	Andamana
<i>Seramanga</i>	Patoc
<i>Djasiman</i>	Sentot

Adaptado de: FAINE (1993)

3.4.3. Rinotraqueíte infecciosa bovina

Conforme preconizado pela OIE (2011), a detecção de anticorpos contra o BoHV-1 foi realizada pela técnica de virusneutralização (VN). Foram utilizadas células MDBK (*Madin Darby bovine kidney*), numa concentração de 3×10^5 , e 200 TCID₅₀ da estirpe Nebraska do BoHV-1, proveniente da Universidade Estadual de Londrina/PR. Foi feita a incubação à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ por 72 horas, até a leitura do efeito citopático. Considerou-se positiva a amostra de soro que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2, e o título foi expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar 200 TCID₅₀.

3.4.4. Diarreia viral bovina

Conforme preconizado pela OIE (2011), a detecção de anticorpos contra o BVDV foi realizada pela VN. Foram utilizadas células MDBK numa concentração de 3×10^5 , e 100 TCID₅₀ da estirpe Singer do BVDV biótipo 1, proveniente do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria/RS. Foi feita a incubação à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ por 96 horas, até a leitura do efeito citopático. Considerou-se positiva a amostra de soro que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:10, e o título foi expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar 100 TCID₅₀.

3.4.5. Neosporose

Conforme preconizado por DUBEY et al. (1988), a detecção de anticorpos contra *N. caninum* foi realizada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Foi utilizada como antígeno a cepa NC-Bahia de *N. caninum* cultivada em células VERO, com ponto de corte de 1:100 (MINERVINO et al., 2008). Foi utilizado conjugado anti-IgG de bovino (Sigma, St. Louis, MO) na diluição de 1:1.000.

3.5. Medidas de associação

As medidas de associação utilizadas podem ser calculadas com o auxílio de uma tabela de contingência, demonstrada no quadro 6.

Quadro 6: Demonstrativo da tabela de contingência.

Condição	Grupo		Total
	Caso	Controle	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Os animais submetidos à estação de monta no período seco têm como medida de associação o RR, cuja fórmula é: $RR = \{a/(a+b)\} / \{c/(c+d)\}$ (THRUSFIELD, 2005).

Os animais submetidos à estação de monta no período chuvoso têm como medida de associação a OR, cuja fórmula é: $OR = (a.d)/(b.c)$ (THRUSFIELD, 2005).

3.6. Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAS® 9.2 (SAS INSTITUTE INC, 2008).

Foi calculado o risco relativo (RR) entre as doenças estudadas e a falha reprodutiva para a estação de “inverno”, e estimado pela odds ratio (OR) para a estação de “verão”. Para determinar a significância estatística dos cálculos, foi utilizado o intervalo de confiança IC a 95% (IC 95%) da OR e do RR, e o qui-quadrado corrigido. O teste exato de Fisher substituiu o teste do qui-quadrado corrigido ($P \leq 0,05$) em ambos os estudos, quando necessário. A associação entre a presença de anticorpos e a falha reprodutiva foi considerada se fosse estatisticamente significativa e o número 1 não fizesse parte do IC 95%. A causalidade ficava sugerida se todo o IC 95% fosse maior que 1.

Entre as sorovariedades de *Leptospira spp.*, havia a hipótese de haver reações cruzadas. Para avaliar como os dados seriam tratados, calculou-se o coeficiente Kappa entre os resultados de todas as sorovariedades, e comparou-se com o proposto por LANDIS E KOCH (1977), descrito no quadro 7.

Quadro 7: Interpretação da concordância pelo coeficiente Kappa

Kappa	Concordância
<0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: Adaptado de LANDIS e KOCH (1977).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra *Brucella abortus* por categoria produtiva e estado gestacional após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra *Brucella abortus* por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.

Categoria produtiva	Resultado sorológico	Estado gestacional		OR	IC 95%		Sign.
		Não Prenhe	Prenhe		Limite inf.	Limite sup.	
Novilhas	Positivo	0	0	-	-	-	-
	Negativo	29	29				
Primíparas	Positivo	0	3	0,0000	-	-	N
	Negativo	20	17				
Vacas	Positivo	4	1	4,1290	0,4531	37,6310	N
	Negativo	93	96				
Total	Positivo	4	4	1,0000	0,2453	4,0767	N
	Negativo	142	142				

Sign. = significância estatística; N = não; inf. = inferior; sup. = superior

Provavelmente, as reações à *B. abortus* na categoria novilhas da estação de “inverno” foram causadas por anticorpos vacinais, pois os animais que a compõem apresentavam idade muito próxima de 24 meses na data da coleta.

Não foram encontrados estudos recentes associando falha na concepção com brucelose. Os resultados encontrados para essa doença concordam com os sinais clínicos descritos nas revisões citadas. A brucelose causa distúrbios mais ao final da gestação. Dos sinais clínicos causados por ela, o único que poderia resultar em falha em conceber seria a retenção de placenta. No entanto, se presente no rebanho estudado, a retenção de placenta ocorre raramente (baixa prevalência de brucelose) e não dura o suficiente para prejudicar a estação de monta.

A distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra BoHV-1 por categoria produtiva e estado gestacional após o fim da estação de monta, Odds ratio

(OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra o Herpesvirus Bovino do tipo 1 por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.

Categoria produtiva	Resultado sorológico	Estado gestacional		OR	IC 95%		Sign.
		Não Prenhe	Prenhe		Limite inf.	Limite sup.	
Novilhas	Positivo	8	18	0,2328	0,0769	0,7044	S
	Negativo	21	11				
Primíparas	Positivo	17	18	0,6296	0,0934	4,2436	N
	Negativo	3	2				
Vacas	Positivo	82	77	1,4199	0,6787	2,9706	N
	Negativo	15	20				
Total	Positivo	107	113	0,8012	0,4699	1,3662	N
	Negativo	39	33				

Sign. = significância estatística; S = sim; N = não; inf. = inferior; sup. = superior

Os resultados concordam com os obtidos por DEL FAVA et al. (2006), que também encontraram taxa de concepção significativamente maior em animais reagentes ao BoHV-1 em um grupo de matrizes selecionadas da raça Nelore.

Essa significância poderia ser atribuída ao fato de parte das infecções terem ocorrido antes da estação de monta, tornando esses animais soropositivos não sujeitos aos sintomas durante a estação de monta. No entanto, a metodologia aqui aplicada não permite testar essa hipótese, pois seria necessário ter pesquisado anticorpos nos animais antes da estação de monta.

A prevalência significativamente maior no grupo controle também pode ser explicada pelo maior contato entre novilhas susceptíveis e touros infectados. Tratando-se de novilhas, todas as fêmeas não púberes durante a estação de monta tiveram menos contato com possíveis touros infectados e, por não terem acasalado, estão no grupo caso. As fêmeas acasaladas foram mais expostas ao BoHV-1.

A distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra BVDV biótipo 1 por categoria produtiva e estado gestacional após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra o *Vírus da Diarréia Viral biotipo 1* por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.

Categoria produtiva	Resultado sorológico	Estado gestacional		OR	IC 95%		Sign.
		Não Prenhe	Prenhe		Limite inf.	Limite sup.	
Novilhas	Positivo	1	0	-	-	-	N
	Negativo	28	29				
Primíparas	Positivo	0	1	0,0000	-	-	N
	Negativo	20	19				
Vacas	Positivo	10	8	1,2787	0,4821	3,3919	N
	Negativo	87	89				
Total	Positivo	11	9	1,2403	0,4980	3,0889	N
	Negativo	135	137				

Sign. = significância estatística; N = não; inf. = inferior; sup. = superior

Não houve resultados significantes para infecção por BVDV biótipo 1.

A distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* por categoria produtiva e estado gestacional após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.

Categoria produtiva	Resultado sorológico	Estado gestacional		OR	IC 95%		Sign.
		Não Prenhe	Prenhe		Limite inf.	Limite sup.	
Novilhas	Positivo	1	2	0,4821	0,0413	5,6320	N
	Negativo	28	27				
Primíparas	Positivo	4	1	4,7500	0,4810	46,9059	N
	Negativo	16	19				
Vacas	Positivo	11	8	1,4229	0,5461	3,7079	N
	Negativo	86	89				
Total	Positivo	16	11	1,5105	0,6756	3,3770	N
	Negativo	130	135				

Sign. = significância estatística; S = sim; N = não; inf. = inferior; sup. = superior

Os resultados concordam com os obtidos por ROMERO et al. (2005), que não encontraram associação da neosporose com aumento no intervalo entre partos, no intervalo entre parto e concepção, e no número de serviços por concepção.

Os resultados discordam dos obtidos por ANDREOTTI et al. (2010) que encontraram associação de infecção por *N. caninum* com falha na concepção, ocorrência de aborto e baixa natalidade. Embora a raça e o tipo de criação sejam parecidos com os utilizados nesta pesquisa, as características do pantanal e do cerrado brasileiro diferem grandemente, com mudanças significativas no manejo. Além disso, a prevalência encontrada por ANDREOTTI et al. (2010) é muito maior do que a encontrada no presente trabalho, o que mostra que a epidemiologia da doença é diferente nas propriedades estudadas, o que também altera o valor preditivo positivo do diagnóstico.

A concordância, medida pelo coeficiente Kappa, entre as sorovarietades de *Leptospira spp.* está descrita no anexo 1. Como foi encontrada apenas uma concordância boa e nenhuma ótima ou perfeita, a possibilidade de reação cruzada foi ignorada.

A distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* com diferentes pontos de corte por categoria produtiva e estado gestacional após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* com diferentes pontos de corte por categoria produtiva de matrizes bovinas da raça Nelore e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística.

Categoria produtiva	Ponto de corte	Resultado sorológico	Estado gestacional		OR	IC 95%		Sign.
			Não Prenhe	Prenhe		Limite inf.	Limite sup.	
Novilhas	100	Positivo	27	28	0,4821	0,0413	5,6320	N
		Negativo	2	1				
	200	Positivo	22	22	1,0000	0,3003	3,3295	N
		Negativo	7	7				
	400	Positivo	17	14	1,5178	0,5378	4,2840	N
		Negativo	12	15				
Primíparas	800	Positivo	4	4	1,0000	0,2248	4,4489	N
		Negativo	25	25				
	100	Positivo	20	20	-	-	-	-
		Negativo	0	0				
	200	Positivo	13	10	1,8571	0,5216	6,6121	N
		Negativo	7	10				
	400	Positivo	9	2	7,3636	1,3373	40,5479	S
		Negativo	11	18				
	800	Positivo	4	1	4,7500	0,4810	46,9059	N
		Negativo	16	19				
Vacas	100	Positivo	80	83	0,7937	0,3671	1,7163	N
		Negativo	17	14				
	200	Positivo	55	58	0,8805	0,4975	1,5586	N
		Negativo	42	39				
	400	Positivo	25	32	0,7052	0,3789	1,3129	N
		Negativo	72	65				
	800	Positivo	8	8	1,0000	0,3595	2,7817	N
		Negativo	89	89				
Total	100	Positivo	127	131	0,7654	0,3727	1,5718	N
		Negativo	19	15				
	200	Positivo	90	90	1,0000	0,6239	1,6028	N
		Negativo	56	56				
	400	Positivo	51	48	1,0961	0,6750	1,7797	N
		Negativo	95	98				
	800	Positivo	16	13	1,2592	0,5826	2,7215	N
		Negativo	130	133				

Sign. = significância estatística; S = sim; N = não; inf. = inferior; sup. = superior

Dentro das sorovariedades de *Leptospira spp.*, estudadas isoladamente, apenas 2 situações foram significativas.

A sorovariedade Wollfi, considerando o título significativo ≥ 400 , apresentou associação com a falha reprodutiva em primíparas (OR = 7,3636; IC95%: 1,3373 - 40,5479; significativo), assim como na infecção considerando qualquer das sorovariedades com esse ponto de corte. As OR também apresentaram o mesmo

valor. Isso porque *L. Wollfi* foi responsável por todos os casos computados considerando-se qualquer das sorovariedades com título ≥ 400 . Apenas 1 dos animais reagentes também apresentava título maior que 400 contra a sorovariedade *Shermani*.

A sorovariedade *Autumnalis*, considerando o título significativo ≥ 200 , apresentou associação com a falha reprodutiva na estação de “verão” (OR = 8,4058; IC95%: 1,0377 – 68,0882; significativo). Essa significância não foi encontrada dentro de cada categoria, pois a OR não pôde ser calculada para primíparas e vacas. Em ambas as situações, não havia nenhum animal controle reagente.

Ambas as sorovariedades não são comumente associadas isoladamente a distúrbios reprodutivos. Aliás, elas mal são utilizadas em estudos epidemiológicos analíticos. Apesar de normalmente utilizada em estudos epidemiológicos descritivos, *L. Wollfi* pertence ao mesmo sorogrupo da sorovariedade *Hardjo*, e sua prevalência pode ser encoberta pela alta prevalência comumente encontrada para a *L. Hardjo* em bovinos.

A inclusão de mais sorovariedades de *Leptospira* spp. deveria ser feita em estudos epidemiológicos analíticos. Isso melhoraria a sensibilidade do teste e forneceria mais dados à comunidade científica sobre as demais sorovariedades.

Em ambas as sorovariedades, o impacto causado pela infecção pode ter sido uma seqüela de leptospirose genital subaguda ou subclínica (FAINE, 1993), como acontece na infecção por *Leptospira* spp., ou por efeitos secundários da infecção sistêmica (JUNQUEIRA & ALFIERI, 2006).

Dadas as prevalências encontradas e a quantidade de testes de associação realizados, o achado de apenas 2 associações pode ser considerado um resultado insatisfatório. No entanto, é importante lembrar que reações à sorovariedade *Pomona*, causadora de distúrbios reprodutivos em infecção aguda (FAINE, 1993), não foram encontradas. A sorovariedade *Hardjo*, causadora de distúrbios reprodutivos em infecção crônica (FAINE, 1993), apresentou prevalência baixa. Quando se consideram os títulos mínimos significativos para regiões endêmicas propostos por ADLER e MOCTEZUMA (2010) e FAINE (1993), ≥ 400 e ≥ 800 , respectivamente, têm-se

prevalências de *L. Hardjo* variando de 5,17% (novilhas) a 0% (novilhas da estação de “inverno”).

A distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos com diferentes pontos de corte por agentes etiológicos e estado gestacional após o fim da estação de monta de “verão”, em novilhas, risco relativo (RR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Distribuição dos resultados de pesquisa de anticorpos com diferentes pontos de corte por agentes etiológicos e estado gestacional entre 60 e 90 dias após o fim da estação de monta no período seco, risco relativo (RR) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e significância estatística em novilhas bovinas da raça Nelore.

Agente etiológico	Ponto de corte	Resultado sorológico	Estado gestacional		RR	IC 95%		Sign.
			Não Prenhe	Prenhe		Limite inf.	Limite sup.	
<i>Brucella abortus</i>	4	Positivo	7	1	1,3926	1,0339	1,8758	N
		Negativo	71	42				
BoHV-1	2	Positivo	54	29	1,0301	0,7712	1,3760	N
		Negativo	24	14				
BVDV	10	Positivo	4	1	1,2541	0,7923	1,9849	N
		Negativo	74	42				
<i>Neospora caninum</i>	100	Positivo	7	3	1,0944	0,7125	1,6808	N
		Negativo	71	40				
	100	Positivo	66	40	0,7783	0,5805	1,0435	N
		Negativo	12	3				
<i>Leptospira spp.</i>	200	Positivo	52	29	0,9877	0,7468	1,3062	N
		Negativo	26	14				
	400	Positivo	35	22	0,9139	0,6993	1,1945	N
		Negativo	43	21				
	800	Positivo	13	3	1,3125	0,9928	1,7351	N
		Negativo	65	40				

Sign. = significância estatística; N = não; inf. = inferior; sup. = superior

Não houve resultados significantes na estação de monta de “inverno”.

De maneira geral, a falta de resultados significativos pode parecer discordar da literatura. No entanto, quando se lê um estudo deste tipo, tende-se a prestar mais atenção nos resultados significativos e ignorar os demais. Alterando a forma de analisar esses estudos, pode-se notar uma concordância parcial do presente trabalho com os resultados obtidos por DAVISON, OTTER e TREES(1999), MUÑOS-ZANZI et al. (2004), WALDNER (2005), BIUK-RUDAN et al. (1999) e JUNQUEIRA et al. (2006).

DAVISON, OTTER e TREES(1999) não encontraram associação de aborto com BVDV, BoHV e *Leptospira* Hardjo.

MUÑOS-ZANZI et al. (2004) não encontraram associação de *L. Hardjo* e Pomona com o número de serviços por concepção. Os resultados obtidos para BVDV dependiam de uma complexa interação de fatores, tendo sido encontrado até mesmo efeito sinérgico entre infecção e reprodução. Infecção por *N. caninum* não foi associada a atraso na primeira cria, o que significa que não foi associada a aborto na primeira cria.

WALDNER (2005) não encontrou associação de falhas reprodutivas com BoHV-1, BVDV biotipo 1, BVDV biotipo 2.

BIUK-RUDAN et al. (1999) não encontraram associação do histórico de falhas reprodutivas com infecções isoladas por BoHV-1 e BVDV.

JUNQUEIRA et al. (2006) não utilizaram grupo controle, logo seus resultados são discutíveis. No entanto, como relato de caso, pode-se notar que mesmo com prevalências altas para BoHV1, BVDV e *Leptospira* Hardjo a taxa de concepção de todos os grupos foi muito próxima de 90%, bem próxima da taxa considerada alta produtividade (JUNQUEIRA & ALFIERI, 2006).

As causas não infecciosas são responsáveis pela maioria das falhas reprodutivas (THUN & JANETT, 2007), conforme sugerem os resultados obtidos. Algumas dessas falhas podem ser corrigidas mais rapidamente e menos onerosamente que as causas infecciosas e, portanto, devem ser descartadas antes de se buscar uma provável causa infecciosa. Sempre que possível, a falha reprodutiva deve ser bem identificada e quantificada, por métodos gerenciais. As prováveis causas devem ser investigadas em todo o rebanho e, se encontrada associação, as medidas preventivas devem ser adotadas, ou não, de acordo com a legislação e o retorno financeiro esperado.

As ocorrências gerais de animais sororreagentes por estação de monta e por categoria produtiva da estação de “verão” estão descritas nos anexos 2 e 3, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

A infecção por *L. Autumnalis* pode ter causado a falha na concepção na estação de monta, considerando todos os animais submetidos a estação de monta no período chuvoso. Assim como a infecção por *L. Wollfi* pode ter causado a falha na concepção na estação de monta em primíparas. Portanto, essas sorovariedades deveriam ser incluídas em futuros estudos analíticos.

Brucelose, IBR, BVD, neosporose e leptospirose causada pelas demais sorovariedades encontradas não prejudicaram a concepção na estação de monta. Isso não exclui a possibilidade de ocorrência de distúrbios posteriores, como abortos mais tardios, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos e etc.

A taxa de concepção, ou prenhez, não é um bom indicador para levantar suspeitas de doenças infecciosas sintomáticas no rebanho, ao menos em situações em que esse indicador encontra-se estável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Brucelosis. In: ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed.** Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2001a. v.1, p.28-55.
- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed.** Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2001b. v.1, p.175-185.
- ACKERMANN, M; WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 9, p. 53-63, 1984.
- ADLER, B. MOCTEZUMA, A.P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 287-296, 2010.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C. Consequências da infecção pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 19, N. 1, p.86-93, março 1998.
- ALTON, G.G. et al. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation test, serum agglutination and rose Bengal test. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 51, n. 2, p. 57-63, 1975.
- ANDREOTTI, J.C.B. et al. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.2, p.119-123, abr.-jun. 2010
- BANAI, M; CORBEL, M. Taxonomy of *Brucella*. **The Open Veterinary Science Journal**, s.l., v.4, p.85-101, 2010.
- BIUK-RUDAN, N. et al. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, Elsevier, Stoneham, MA, EUA, V.51, p.875-881, 1999.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e**

Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT): manual técnico, Brasília, 2006, 188p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa SDA nº 6. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 jan. 2004. Seção 1, p. 6-10.

CALEGARE, L.; ALBERTINI, T.Z; LANNA, D.P.D. Eficiência da vaca de cria. In: Pires, A.V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010, V.1, Cap. 8, p.143-158.

CONRATHS, F.J. et al. Control Measures: Neosporosis. In: ORTEGA-MORA, L.M. et al. **Protozoal abortion in farm animals: Guidelines for diagnosis and control**. CAB International, Cambridge, MA, EUA, c.5, p.276-283, 2007.

CONRATHS, F.J.; GOTTSTEIN, B. Aetiological Diagnosis: Neosporosis. In: ORTEGA-MORA, L.M. et al. **Protozoal abortion in farm animals: Guidelines for diagnosis and control**. CAB International, Cambridge, MA, EUA, c.3, p.42-121, 2007.

CORBEL, M.J. et al. **Brucellosis in humans and animals**. World Health Association. Genova, Suíça, c. 2-4 (anexo 6) p. 3-35, 2006

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

DAVISON H.C.; OTTER A.; TREES A.J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. **International Journal of Parasitology**, v. 9, n. 8, p. 1189-94, ago, 1999.

DEL FAVA et al. Reproductive rates and performance traits in beef cattle infected by Bovine Herpesvirus. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 739-746, 2006.

DE ZEN, S.; BARROS, G. S. de C. Evolução do mercado brasileiro da carne bovina. In: Pires, A.V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010, V.1, Cap. 3, p. 41-54.

DUBEY, J.P., HATTEL, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J. Neonatal *Neospora caninum* in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 193, p. 1259–1263, 1988.

- EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V.P.B. Desenvolvimento recente da pecuária de corte brasileira e suas perspectivas. In: Pires, A.V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010, v.1, Cap. 2, p. 11-40.
- FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA, 353p, 1993
- FERREIRA-NETO, J. S. et al. **Situação epidemiológica da brucelose no Brasil**. O Biológico, Instituto Biológico, São Paulo, SP, v. 73, suplemento 2, p-45, 2011.
- FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. *Herpesviridae*. In: FLORES, E.F. (Org.) **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria, 2007, c. 17, p. 433-488.
- GUIMARÃES-JUNIOR, J. DA S.; ROMANELLI, P.R. Neosporose em animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 665-678, out./dez. 2006.
- HADAD, C.M.; MENDES, C.Q. Manejo da estação de monta, das vacas e das crias. In: Pires, A.V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010, V.1, Cap. 7, p. 129-142.
- JUNQUEIRA, J. R.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 289-298, abr./jun. 2006
- JUNQUEIRA, J.R.C. et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira* Hardjo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.3, p.471-480, jul./set. 2006.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The Measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Arlington, TX, EUA, v.33, p. 159-174, 1977.
- MINERVINO, A.H.H.; RAGOZO, A.M.A.; MONTEIRO, R.M.; ORTOLANI, E.L.; GENNARI, S.M.; Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 254-256, 2008.
- MUÑOZ-ZANZI, C.A. et al. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers. **Theriogenology**, Elsevier, Stoneham, MA, EUA, v.61, p.1085–1099, 2004
- MURPHY, F. A. et al. *Flaviviridae* In: MURPHY, F. A. et al. **Veterinary Virology**. 3 ed. Academic Press. San Diego, CA, EUA. C. 39, p. 555-570, 1999a.

MURPHY, F. A. et al. Herpesviridae. In: MURPHY, F. A. et al. **Veterinary Virology**. 3 ed. Academic Press. San Diego, CA, EUA. C. 18, p. 301-326, 1999b.

NANDI, S. et al. Bovine herpes vírus infection in cattle. **Animal Health Research Reviews**. Cambridge, n. 10(1), p. 85–98, 2009.

OIE. **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals 2011**. CHAPTER 2.1.9. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 20/12/2011a.

OIE. **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals 2011**. CHAPTER 2.4.13 (Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010). Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 21/09/2011b.

OIE. **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals 2011**. CHAPTER 2.4.8. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 21/09/2011c.

OIE. **WAHID INTERFACE**. Disponível em: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_lists>. Acesso em: 02/04/2012

PIRES, A.V. et al. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva de bovinos de corte. In: Pires, A.V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010, V.1, Cap.31, p.611-636.

PTASZYNSKA, M. Distúrbios reprodutivos. In: PTASZYNSKA, M. (Ed.). **Compêndio de reprodução animal**. Intervet International, s.l., [2007?], p.67-100.

RIDPATH, J.; FLORES, E.F. Flaviviridae In: FLORES, E.F. (Org.) **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria, 2007, c. 22, p. 563-592.

ROMERO, J.J. et al. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. Elsevier, **Theriogenology**, Elsevier, Stoneham, MA, EUA, V.64, p.1928–1939, 2005.

SAS INSTITUTE INC. SAS® 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008.

THRUSFIELD, M. Observational studies. In: THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, c. 15, p. 266-288, 2005.

THUN, R.; JANETT, F. Background to reproductive problems in cattle and sheep. In: ORTEGA-MORA, L.M. et al..**Protozoal abortion in farm animals**: Guidelines for diagnosis and control. CAB International, Cambridge, MA, EUA, c.1, p.01-15, 2007.

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

Anexo 1: Concordância pelo coeficiente Kappa entre as sorovariades encontradas de *Leptospira* spp. em matrizes bovinas da raça Nelore.

	AUS	AUT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	HEB	ICT	PYR	SEN	SHE	TAR	WHI	WOL
AUS	1,000	0,161	0,474	0,037	-0,005	-0,066	0,011	-0,019	0,004	0,183	-0,004	0,001	-0,010	0,101	0,071	0,002	0,023
AUT	0,161	1,000	0,307	0,102	-0,005	0,039	0,062	-0,018	0,091	0,086	0,062	-0,015	-0,009	0,118	0,060	-0,013	0,005
BRA	0,474	0,307	1,000	0,056	-0,005	0,006	0,021	-0,019	0,001	0,221	0,021	-0,006	-0,010	0,179	0,102	0,003	-0,003
BUT	0,037	0,102	0,056	1,000	-0,005	0,052	-0,016	-0,016	0,004	0,119	-0,016	-0,012	-0,009	0,061	0,071	-0,035	0,015
CAN	-0,005	-0,005	-0,005	1,000	-0,005	-0,005	-0,004	-0,004	-0,005	-0,005	-0,004	-0,005	-0,003	-0,005	-0,005	-0,005	0,003
CAS	-0,066	0,039	0,006	0,052	1,000	-0,017	1,000	-0,017	0,103	-0,013	0,056	0,047	-0,009	0,027	-0,005	0,075	-0,004
COP	0,011	0,062	0,021	-0,016	-0,004	-0,017	1,000	-0,010	0,063	-0,019	0,243	0,099	-0,007	-0,006	-0,016	-0,015	-0,012
GRI	-0,019	-0,018	-0,019	-0,016	-0,004	-0,017	-0,010	1,000	0,023	-0,005	0,243	-0,018	-0,007	-0,019	-0,016	-0,015	0,003
HAR	0,004	0,091	0,001	0,004	-0,005	0,103	0,063	0,023	1,000	0,077	-0,018	0,700	-0,009	0,050	0,062	0,241	0,026
HEB	0,183	0,086	0,221	0,119	-0,005	-0,013	-0,019	-0,005	0,077	1,000	-0,005	0,024	0,005	0,287	0,109	-0,014	0,168
ICT	-0,004	0,062	0,021	-0,016	-0,004	0,056	0,243	0,243	-0,018	-0,005	1,000	-0,018	-0,007	-0,019	-0,016	-0,015	0,003
PYR	0,001	-0,015	-0,006	-0,012	-0,005	0,047	0,099	-0,018	0,700	0,024	-0,018	1,000	-0,009	-0,005	0,067	0,248	0,039
SEN	-0,010	-0,009	-0,010	-0,009	-0,003	-0,009	-0,007	-0,007	-0,009	0,005	-0,007	-0,009	1,000	0,004	-0,009	-0,008	0,005
SHE	0,101	0,118	0,179	0,061	-0,005	0,027	-0,006	-0,019	0,050	0,287	-0,019	-0,005	0,004	1,000	0,153	-0,005	-0,020
TAR	0,071	0,060	0,102	0,071	-0,005	-0,005	-0,016	-0,016	0,062	0,109	-0,016	0,067	-0,009	0,153	1,000	-0,037	0,028
WHI	0,002	-0,013	0,003	-0,035	-0,005	0,075	-0,015	-0,015	0,241	-0,014	-0,015	0,248	-0,008	-0,005	-0,037	1,000	0,009
WOL	0,023	0,005	-0,003	0,015	0,003	-0,004	-0,012	0,003	0,026	0,168	0,003	0,039	0,005	-0,020	0,028	0,009	1,000

ANEXO 2

Anexo 2: Soroprevalência de anticorpos contra diversos agentes etiológico, com pontos de corte diferentes, em fêmeas bovinas da raça Nelore em duas estações de monta.

Agente Etiológico	Ponto de corte	Estação de "verão"		Estação de "Inverno"	
		Prev.	%	Prev.	%
<i>Brucella abortus</i>	4	8 /292	2,74	8 /121	6,61
BoHV-1	2	220 /292	75,34	83 /121	68,60
BVDV	10	20 /292	6,85	5 /121	4,13
<i>Neospora caninum</i>	100	27 /292	9,25	10 /121	8,26
	100	258 /292	88,36	106 /121	87,60
<i>Leptospira spp.</i>	200	180 /292	61,64	81 /121	66,94
	400	99 /292	33,90	57 /121	47,11
	800	29 /292	9,93	16 /121	13,22
	100	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira Andamana</i>	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	100	79 /292	27,05	53 /121	43,80
<i>Leptospira Australis</i>	200	39 /292	13,36	32 /121	26,45
	400	12 /292	4,11	15 /121	12,40
	800	4 /292	1,37	4 /121	3,31
	100	27 /292	9,25	20 /121	16,53
<i>Leptospira Autumnalis</i>	200	9 /292	3,08	7 /121	5,79
	400	3 /292	1,03	1 /121	0,83
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	100	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira Bataviae</i>	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	100	55 /292	18,84	43 /121	35,54
<i>Leptospira Bratislava</i>	200	23 /292	7,88	24 /121	19,83
	400	8 /292	2,74	11 /121	9,09
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	100	10 /292	3,42	7 /121	5,79
<i>Leptospira Butembo</i>	200	1 /292	0,34	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	100	1 /292	0,34	0 /121	0,00
<i>Leptospira Canicola</i>	200	1 /292	0,34	0 /121	0,00
	400	1 /292	0,34	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	100	20 /292	6,85	4 /121	3,31
<i>Leptospira Castellonis</i>	200	4 /292	1,37	0 /121	0,00
	400	1 /292	0,34	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00

Continuação do anexo 2.

Agente Etiológico	Ponto de corte	Estação de "verão"		Estação de "Inverno"	
		Prev.	%	Prev.	%
<i>Leptospira</i> Copenhageni	100	3 /292	1,03	1 /121	0,83
	200	0 /292	0,00	1 /121	0,83
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Cynopteri	100	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Grippotyphosa	100	4 /292	1,37	0 /121	0,00
	200	2 /292	0,68	0 /121	0,00
	400	2 /292	0,68	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Hardjo	100	36 /292	12,33	10 /121	8,26
	200	9 /292	3,08	5 /121	4,13
	400	3 /292	1,03	1 /121	0,83
	800	1 /292	0,34	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Hebdomadis	100	79 /292	27,05	57 /121	47,11
	200	10 /292	3,42	2 /121	1,65
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Icterohaemorrhagiae	100	3 /292	1,03	1 /121	0,83
	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Javanica	100	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Panama	100	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Patoc	100	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Pomona	100	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	200	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00

Continuação do anexo 2.

Agente Etiológico	Ponto de corte	Estação de "verão"		Estação de "Inverno"	
		Prev.	%	Prev.	%
<i>Leptospira</i> Pyrogenes	100	25 /292	8,56	6 /121	4,96
	200	11 /292	3,77	4 /121	3,31
	400	2 /292	0,68	2 /121	1,65
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Sentot	100	0 /292	0,00	2 /121	1,65
	200	0 /292	0,00	1 /121	0,83
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Shermani	100	94 /292	32,19	58 /121	47,93
	200	22 /292	7,53	11 /121	9,09
	400	3 /292	1,03	1 /121	0,83
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Tarassovi	100	11 /292	3,77	8 /121	6,61
	200	2 /292	0,68	5 /121	4,13
	400	0 /292	0,00	1 /121	0,83
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Whitcombi	100	10 /292	3,42	2 /121	1,65
	200	1 /292	0,34	0 /121	0,00
	400	0 /292	0,00	0 /121	0,00
	800	0 /292	0,00	0 /121	0,00
<i>Leptospira</i> Wolffi	100	191 /292	65,41	76 /121	62,81
	200	144 /292	49,32	66 /121	54,55
	400	79 /292	27,05	44 /121	36,36
	800	25 /292	8,56	12 /121	9,92

ANEXO 3

Anexo 3: Soroprevalências de anticorpos contra diversos agentes etiológicos, com diferentes pontos de corte, em fêmeas bovinas da raça Nelore, divididas por categoria produtiva, após a

Agente Etiológico	Ponto de corte	Novilhas		Primíparas		Vacas	
		Prev.	%	Prev.	%	Prev.	%
<i>Brucella abortus</i>	4	0 /58	0,00	3 /40	7,50	5 /194	2,58
BoHV-1	2	26 /58	44,83	35 /40	87,50	159 /194	81,96
BVDV	10	1 /58	1,72	1 /40	2,50	18 /194	9,28
<i>Neospora caninum</i>	100	3 /58	5,17	5 /40	12,50	19 /194	9,79
	100	55 /58	94,83	40 /40	100,00	163 /194	84,02
<i>Leptospira spp.</i>	200	44 /58	75,86	23 /40	57,50	113 /194	58,25
	400	31 /58	53,45	11 /40	27,50	57 /194	29,38
	800	8 /58	13,79	5 /40	12,50	16 /194	8,25
	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira Andamana</i>	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	100	32 /58	55,17	15 /40	37,50	32 /194	16,49
<i>Leptospira Australis</i>	200	25 /58	43,10	4 /40	10,00	10 /194	5,15
	400	12 /58	20,69	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	4 /58	6,90	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	100	8 /58	13,79	7 /40	17,50	12 /194	6,19
<i>Leptospira Autumnalis</i>	200	5 /58	8,62	1 /40	2,50	3 /194	1,55
	400	3 /58	5,17	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira Bataviae</i>	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	100	30 /58	51,72	9 /40	22,50	16 /194	8,25
<i>Leptospira Bratislava</i>	200	16 /58	27,59	3 /40	7,50	4 /194	2,06
	400	8 /58	13,79	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	100	5 /58	8,62	3 /40	7,50	2 /194	1,03
<i>Leptospira Butembo</i>	200	1 /58	1,72	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	1 /194	0,52
<i>Leptospira Canicola</i>	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	1 /194	0,52
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	1 /194	0,52
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	100	4 /58	6,90	4 /40	10,00	12 /194	6,19
<i>Leptospira Castellonis</i>	200	1 /58	1,72	0 /40	0,00	3 /194	1,55
	400	1 /58	1,72	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00

Continuação do anexo 3.

Agente Etiológico	Ponto de corte	Novilhas		Primíparas		Vacas	
		Prev.	%	Prev.	%	Prev.	%
<i>Leptospira</i> Copenhageni	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	3 /194	1,55
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Cynopteri	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Grippotyphosa	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	4 /194	2,06
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	2 /194	1,03
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	2 /194	1,03
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Hardjo	100	10 /58	17,24	6 /40	15,00	20 /194	10,31
	200	4 /58	6,90	2 /40	5,00	3 /194	1,55
	400	3 /58	5,17	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	1 /58	1,72	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Hebdomadis	100	35 /58	60,34	30 /40	75,00	14 /194	7,22
	200	2 /58	3,45	3 /40	7,50	5 /194	2,58
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Icterohaemorrhagiae	100	0 /58	0,00	1 /40	2,50	2 /194	1,03
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Javanica	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Panama	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Patoc	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Pomona	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00

Continuação do anexo 3.

Agente Etiológico	Ponto de corte	Novilhas		Primíparas		Vacas	
		Prev.	%	Prev.	%	Prev.	%
<i>Leptospira</i> Pyrogenes	100	6 /58	10,34	2 /40	5,00	17 /194	8,76
	200	4 /58	6,90	2 /40	5,00	5 /194	2,58
	400	2 /58	3,45	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Sentot	100	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Shermani	100	31 /58	53,45	18 /40	45,00	45 /194	23,20
	200	2 /58	3,45	1 /40	2,50	19 /194	9,79
	400	0 /58	0,00	1 /40	2,50	2 /194	1,03
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Tarassovi	100	3 /58	5,17	6 /40	15,00	2 /194	1,03
	200	1 /58	1,72	1 /40	2,50	0 /194	0,00
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Whitcombi	100	2 /58	3,45	0 /40	0,00	8 /194	4,12
	200	0 /58	0,00	0 /40	0,00	1 /194	0,52
	400	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
	800	0 /58	0,00	0 /40	0,00	0 /194	0,00
<i>Leptospira</i> Wolffi	100	36 /58	62,07	28 /40	70,00	127 /194	65,46
	200	29 /58	50,00	22 /40	55,00	93 /194	47,94
	400	16 /58	27,59	11 /40	27,50	52 /194	26,80
	800	4 /58	6,90	5 /40	12,50	16 /194	8,25