

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

FÁBIO ANDRADE BESSA DE LIMA

**INFECÇÃO PELO ALPHAHERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1, VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA E *Brucella abortus* EM FÊMEAS BOVINAS DE CORTE ABATIDAS
EM UM FRIGORÍFICO SOB SIF NO ESTADO DO MARANHÃO**

São Luís

2017

FÁBIO ANDRADE BESSA DE LIMA

**INFECÇÃO PELO ALPHAHERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1, VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA E *Brucella abortus* EM FÊMEAS BOVINAS DE CORTE ABATIDAS
EM UM FRIGORÍFICO SOB SIF NO ESTADO DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do grau de mestre em Defesa Sanitária Animal.

Área: Defesa Sanitária Animal

Orientador: Prof. Dr. Helder De Moraes Pereira

São Luís

2017

Lima, Fábio Andrade Bessa de.

Infecção pelo alphaherpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina e *Brucella abortus* em fêmeas bovinas de corte abatidas em um frigorífico sob SIF no estado do Maranhão / Fábio Andrade Bessa de Lima. – São Luís, 2017.

... f.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira

1. Bovino. 2. Maranhão. 3. Brucelose. 4. BVD. 5. IBR. I. Título.

CDU 636.033:616.993(812.1)

FÁBIO ANDRADE BESSA DE LIMA

INFECÇÃO PELO ALPHAHERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1, VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E *Brucella abortus* EM FÊMEAS BOVINAS DE CORTE ABATIDAS EM UM FRIGORÍFICO SOB SIF NO ESTADO DO MARANHÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do grau de mestre em Defesa Sanitária Animal.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira (Orientador)

Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

Universidade Estadual do Maranhão

Prof.^a Dra. Sonália Ferreira da Paixão

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão

Dedico este trabalho aos meus avós João Nonato de Andrade (*in memorian*), Neide Lecomte de Andrade (*in memorian*) e Inah de Carvalho Lima, pelo legado de amor e dedicação à família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus Pai, Todo Poderoso, criador de todas as coisas visíveis e invisíveis, pelo dom da vida, por sua infinita misericórdia e pelo amor tão grande com que nos ama.

Agradeço aos meus pais, Evandro Bessa de Lima Filho e Iracema Andrade de Lima, pelo exemplo de caráter, honradez e honestidade; por nos proporcionar, a mim e a meus irmãos, o maior bem que os pais podem dar a seus filhos: a educação; e pelo constante incentivo.

Ao meu amor, Taylanne Rocha, minha poesia, com quem eu quero estar pelo resto da minha vida, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio e incentivo diários, e pela revisão de texto.

À Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, ao Centro de Ciências Agrárias, à coordenação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal – MPDSA e a seu corpo docente e administrativo pela oportunidade e auxílio acadêmico e científico.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela concessão de licença parcial para realização deste projeto.

Ao Fundo de Desenvolvimento Pecuário do Maranhão, na pessoa do seu presidente, o colega e professor Osvaldo Serra, pelo patrocínio desta pós-graduação concedido não só a mim, mas a dezenas de médicos veterinários do Maranhão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA, por disponibilizar os recursos para aquisição dos meios de diagnóstico.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira, pelo fundamental acompanhamento e orientação, e por me fazer sair da minha zona de conforto propondo um novo projeto e, com ele, novos desafios.

Ao Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos, por disponibilizar toda a estrutura e equipe do Laboratório de Doenças Infecciosas – LDI da UEMA, pelo conhecimento e experiência compartilhados e pela sua história de dedicação profissional à sanidade animal no estado do Maranhão.

A toda a equipe técnica, estagiários e bolsistas do LDI que, da fase de coleta de amostras até a leitura dos testes, foram essenciais para o sucesso do trabalho: Amanda Silva, Carolina Torres, Diego Moraes, Émerson Araújo, Felipe Chaves, Juliana Alves, Leandro Sousa,

Leny Porto, Lorena Souto, Natália Lustosa, Naylla Campos, Pablo Sousa, Paula Costa, Priscila Alencar e Thaís Bastos.

Aos senhores Roberto Dantas, Flávio Franklin Freire, Renata Araújo e toda a equipe do abatedouro frigorífico que, percebendo a importância da pesquisa, disponibilizou suas instalações para a execução do trabalho.

À colega Rachel Akashi e toda sua equipe pelo auxílio inestimável, pelo companheirismo e pelo incentivo.

Aos colegas da Unidade de Vigilância Agropecuária do Porto do Itaqui-Madeira, particularmente ao Dr. Altamiro Ferraz Júnior, pela compreensão nos momentos em que precisei me dedicar integralmente à pesquisa.

Aos colegas da 2ª turma do MPDSA pelo companheirismo nesta jornada e pelas elevadas discussões técnicas e científicas dentro e fora da sala de aula.

Ao colega Roberto Carlos Negreiros de Arruda pelo constante incentivo profissional e científico.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estimar a prevalência aparente e a prevalência verdadeira de animais reagentes para BoHV-1, BVDV e pela bactéria *Brucella abortus*. Foram colhidas em um abatedouro frigorífico registrado no Serviço de Inspeção Federal entre julho/2015 e junho/2016 amostras de sangue de 650 fêmeas bovinas de corte de 14 lotes aleatórios oriundos de municípios do estado do Maranhão. Para o diagnóstico da *Brucella abortus* foram utilizados os testes de soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado e do 2-Mercaptoetanol. Para a pesquisa dos anticorpos contra o BoHV-1 e o BVDV foram analisadas 364 amostras de 13 lotes escolhidas através de sorteio, utilizando-se os kits de ELISA indireto IDEXX IBR gB X3 Ab e IDEXX BVDV Total Ab. Das 650 amostras analisadas 1,23% (8/650) resultaram positivas para Brucelose. Dos 14 lotes, 5 continham pelo menos um animal positivo. Das amostras analisadas para BVDV, 65,66% (239/364) e 100% dos lotes (13/13) foram positivos. Para BoHV-1, 85,99% (313/364) e 100% dos lotes (13/13) reagiram positivamente. A prevalência verdadeira estimada para o BVDV e o BoHV-1, calculada levando-se em consideração a especificidade e a sensibilidade informada nos kits de ELISA, foi estimada em 68,02% e 85,96%, respectivamente. Apenas os lotes nº 4, 7, 8, 10 e 12 apresentaram animais reagentes para os 3 patógenos estudados. Constatou-se ainda que a variabilidade de prevalência entre os lotes encontrada para Brucelose ($s=6,17$) é alta e que a variabilidade de prevalência entre os lotes encontrada para o BVDV ($s=0,244$) é maior que a encontrada para o BoHV-1 ($s=0,096$).

Palavras-chave: Brucelose. IBR. BVD. Prevalência.

ABSTRACT

The present study aimed to estimate the apparent prevalence and true prevalence of reactive animals for BoHV-1, BVDV and *Brucella abortus*. Blood samples from 650 beef cows from 14 random batches from municipalities in the state of Maranhão were collected in a slaughterhouse registered at the Federal Inspection Service between July / 2015 and June / 2016. For the diagnosis of *Brucella abortus* the serum agglutination tests with Acidified Buffered Acid and 2-Mercaptoethanol were used. In order to investigate the antibodies against BoHV-1 and BVDV, 364 samples from 13 batches chosen by lottery were analyzed using the IDEXX IBR gb X3 Ab and IDEXX BVDV Total Ab kits. Of the 650 samples analyzed, 1.23% (8/650) were positive for Brucellosis. Of the 14 batches, five contained at least one positive animal. Of the samples analyzed for BVDV, 65.66% (239/364) and 100% of the batches (13/13) were positive. For BoHV-1, 85.99% (313/364) and 100% of batches (13/13) reacted positively. The estimated true prevalence for BVDV and BoHV-1, calculated taking into account the specificity and sensitivity reported in the ELISA kits, was estimated at 68.02% and 85.96%, respectively. Only batches No. 4, 7, 8, 10 and 12 presented reactive animals for the three pathogens studied. It was also found that the prevalence variability among the lots found for Brucellosis ($s = 6.17$) is high and that the prevalence variability among lots found for BVDV ($s = 0.244$) is higher than that found for BoHV -1 ($s = 0.096$).

Key words: Brucellosis. IBR. BVD. Prevalence.

LISTA DE SIGLAS

2-ME – 2-Mercaptoetanol

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

AGED – Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

ATT – Antígeno Acidificado Tamponado

BoHV-1 – Alphaherpesvírus bovino tipo 1

BVD – Diarreia Viral Bovina

BVDV – Vírus da Diarreia Viral Bovina

ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimática

FBS – Soro fetal bovino

FC – Fixação de Complemento

FPA – Polarização Fluorescente

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBR – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

IFA – Imunofluorescência

IMESC – Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OIE – Organização Mundial para Saúde Animal

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PI – Persistentemente infectados

PIB – Produto Interno Bruto

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SIGSIF – Sistema de Informações Gerenciais do SIF

TEC – Tonelada Equivalente Carcaça

TMB – Tetrametilbenzidina

UF – Unidade Federativa

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2	Objetivos	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	Revisão de literatura	17
3.1	Brucelose bovina	17
3.2	Diarreia Viral Bovina	24
3.3	Rinitroqueíte Infecciosa Bovina	30
4	Material e métodos	36
4.1	Local do experimento	36
4.2	Delineamento amostral	37
4.3	Colheita das amostras	37
4.4	Processamento das amostras	38
4.5	Técnicas de diagnóstico	38
4.5.1	<i>Brucella abortus</i>	38
4.5.2	BVDV	39
4.5.3	BoHV-1	40
4.6	Análise de dados	41
5	Resultados e discussão	42
6	Conclusão	49
7	Considerações finais	50
	Referências	41

1 INTRODUÇÃO

Na última década, o Brasil consolidou sua posição como maior produtor e maior exportador de carne bovina do mundo, chegando a 2015 com um rebanho de 215,2 milhões de cabeças, 1,3% maior que em 2014 (IBGE, 2015). Em 2015, o abate de bovinos no país alcançou 39,16 milhões de cabeças (ABIEC, 2016) – 24,97 milhões destas somente em abatedouros frigoríficos registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (SIGSIF, 2017). No mesmo ano, a produção total de carne bovina no Brasil foi de 9,56 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC), com 1,88 milhões de TEC destinados à exportação (ABIEC, 2016), correspondendo a 17,3% do comércio mundial do produto.

Além de maior produtor e exportador de carne bovina, o Brasil figura entre os quatro maiores exportadores de bovinos vivos do mundo – Canadá, Austrália e México são os três primeiros (SCOT CONSULTORIA, 2015). Em 2016, foram exportados 292,55 mil cabeças de bovinos vivos pelo Brasil, 37,9% a mais que o ano anterior. Turquia, Líbano e Egito são os principais mercados compradores dos animais brasileiros (ALICE WEB, 2017).

No estado do Maranhão, a atividade que registrou o maior crescimento real no ano de 2014 foi a agropecuária, apresentando incremento de 9,6% na taxa de variação do índice de volume do Valor Adicionado Bruto a preços básicos do setor, conforme informações da última aferição oficial realizada pelo Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos (IMESC). Considerando apenas a pecuária, o crescimento em volume foi de 2,8%, acarretado pelo aumento no rebanho bovino, que evoluiu de 7.611.324 cabeças em 2013 para 7.758.324 em 2014, apresentando crescimento de 1,9% (IMESC, 2016).

Outro elemento que colaborou para o desenvolvimento da pecuária no estado foi o reconhecimento internacional do Maranhão como Zona Livre de Febre Aftosa com vacinação em maio de 2014, resultando na elevação de 34% no preço da arroba do boi gordo, que variou de R\$ 98,79 em dezembro de 2013 para R\$ 132,39 em dezembro de 2014 (IMESC, 2016).

O abate de bovinos também cresceu no estado entre 2014 e 2015. Com 480.781 cabeças abatidas em estabelecimentos sob SIF – 43.108 a mais que o ano anterior – o Maranhão se consolidou como maior produtor da região Nordeste, à frente da Bahia pelo segundo ano consecutivo (SIGSIF, 2017).

Além do crescimento do abate, em 2015 o estado do Maranhão deu início a exportação de bovinos vivos para engorda e/ou abate imediato, atividade que não fazia parte da

cadeia produtiva da pecuária maranhense. Em um primeiro momento como saída emergencial para animais quarentenados no estado do Pará, em decorrência de acidente que interditou o porto de Vila do Conde (Barcarena – PA), foram exportados pelo porto do Itaqui, em São Luís – MA, 16.588 cabeças com destino à Venezuela, até então o maior comprador de gado vivo do Brasil. Posteriormente, em 2016, foram exportados em três embarques para o Líbano 11.049 animais produzidos no estado (MDIC, 2017).

A despeito da conquista de novos mercados, a importância atribuída à erradicação da febre aftosa durante décadas relegou outras enfermidades de bovinos a um segundo plano (FLORES et al., 2005). Consequentemente, a prevalência e a etiologia de enfermidades infectocontagiosas de grande importância na produção animal, inclusive aquelas causadoras de distúrbios da reprodução em bovinos, não tiveram a devida atenção seja em âmbito estadual, seja em âmbito regional.

Alterações nos parâmetros reprodutivos – como, por exemplo, o aumento no intervalo entre partos, a mortalidade embrionária e fetal, a natimortalidade, o nascimento de bezerros fracos e a repetição do cio – configuram graves problemas em rebanhos de interesse econômico na pecuária de corte. Tendo em vista que podem ser causadas por uma variedade de fatores, infecciosos ou não, muitas vezes o diagnóstico do agente etiológico deixa de ser efetuado, prejudicando severamente a definição do método de controle e prevenção de tais perdas. Ao mesmo tempo, iniciar um programa sanitário em um rebanho desprovido do diagnóstico diferencial resulta em desperdício de recursos e pode criar condições favoráveis para disseminação do agente entre os animais (GIVENS, 2006; JUNQUEIRA & ALFIERI, 2006).

Neste cenário, patógenos como o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e a bactéria *Brucella abortus* são agentes de grande importância etiológica, visto que são igualmente capazes de interferir na avaliação da eficiência reprodutiva do rebanho e estão amplamente disseminados no Brasil e no mundo (BOREL et al., 2014; DE FIGUEIREDO et al., 2015; MOTA et al., 2016; CLEMENTINO & AZEVEDO, 2016; RICHTER et al., 2017).

As enfermidades causadas por estes agentes apresentam sinais clínicos bastante semelhantes e as amostras coletadas para diagnóstico laboratorial nem sempre são adequadas ao diagnóstico diferencial. A determinação da causa de um aborto, por exemplo, deveria começar com o protocolo de amostragem correto a campo (BOREL et al., 2014). O Quadro 1 apresenta os principais sinais clínicos relacionados a essas enfermidades:

Quadro 1 – Sinais clínicos ocasionados pelos principais patógenos do aparelho reprodutivo de bovinos.

	<i>Brucella abortus</i>	BVDV	BoHV-1
Repetição de cio regular			X
Repetição de cio irregular		X	X
Abortamento	X	X	X
Natimortalidade		X	X
Mortalidade neonatal			X
Nascimento de animais fracos		X	X
Retenção de placenta	X		

Fonte: JUNQUEIRA & ALFIERI, 2006 (adaptada).

Enfermidades como a Brucelose, a Diarreia Viral Bovina (BVD) e a Rinotraqueíte Viral Bovina (IBR), elencadas pela Organização Mundial para Saúde Animal (OIE) como doenças de notificação obrigatória, são endêmicas no Brasil e no mundo (OIE, 2017; WAHIS, 2017). Em diversos levantamentos sorológicos realizados em diferentes regiões do Brasil e do mundo foi demonstrado que grande parte dos animais do plantel de reprodução de rebanhos de corte e leite é positiva para um, dois ou mesmo para três desses agentes etiológicos simultaneamente (JUNQUEIRA & ALFIERI, 2006; DEL FAVA et al., 2006; DEL FAVA et al., 2007; JOYA et al., 2011).

Além de causarem prejuízos no médio e no longo prazo para a produção animal em qualquer escala, tais agentes também têm grande impacto no comércio internacional de produtos e subprodutos de origem animal (ALFIERI & ALFIERI, 2017). Impactam ainda no processo de certificação para a exportação de bovinos vivos, seja para engorda, abate ou reprodução. Os principais países importadores exigem que a autoridade sanitária brasileira chancelo o status sanitário dos animais declarando formalmente a cada embarque a ausência de sinais clínicos para tais enfermidades e que os animais a serem exportados com a finalidade de reprodução sejam testados negativamente para *Brucella abortus*, BVDV e BoHV-1 (SISREC, 2017).

A Turquia, atualmente o maior importador de bovinos vivos do Brasil, exige que os animais exportados com a finalidade de abate imediato sejam testados com resultado negativo para brucelose bovina 30 dias do embarque ou provenham de rebanhos reconhecidos como oficialmente livres da enfermidade. Se a finalidade da exportação for engorda, caso não tenham sido vacinados até os 4 meses de idade, os animais devem ser testados para IBR, bem como

para BVD, à procura de animais persistentemente infectados (PI), até 21 dias antes do embarque, e vacinados contra BVD, além do resultado negativo para brucelose (SISREC, 2017).

Assim, diante da importância da pecuária de corte para a economia maranhense, da atual condição sanitária que o rebanho bovino do estado apresenta e dos altos índices de prevalência identificados em estudos pregressos – como se pode verificar na revisão de literatura a seguir –, torna-se fundamental o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam o perfil sorológico dos animais referente a enfermidades potencialmente causadoras de distúrbios reprodutivos.

Sabendo-se que diagnóstico diferencial de tais doenças é de fundamental importância para se estabelecer a ocorrência, distribuição e caracterização dos agentes, assim como para definir estratégias de vacinação, manejo profilático e desenvolvimento de vacinas, o presente trabalho propõe-se a fornecer subsídios ao desenvolvimento de programas sanitários privados e/ou institucionais e assim minimizar possíveis perdas econômicas na pecuária de corte maranhense.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência de infecção pelo BoHV-1, BVDV e *Brucella abortus* em fêmeas de corte abatidas em um abatedouro frigorífico registrado no SIF no estado do Maranhão.

2.2 Objetivos específicos

1. Estimar a prevalência verdadeira de animais reagentes para BoHV-1, BVDV e *Brucella abortus* com base na especificidade e sensibilidade dos testes diagnósticos;
2. Definir a prevalência de focos de BoHV-1, BVDV e *Brucella abortus* entre os lotes estudados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Brucelose bovina

A brucelose bovina é uma zoonose infecciosa causada pela *Brucella abortus*, uma proteobactéria gram-negativa do gênero *Brucella*, da família *Brucellaceae*, da ordem Rhizobiales e da classe Alphaproteobacteria, conforme o Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea (GARRITY et al., 2007).

Em alguns países do sul da Europa, África e oeste da Ásia, onde bovinos são criados em associação com rebanhos caprinos e ovinos, também pode ser causada pela *B. melitensis*. Ocasionalmente a *B. suis* pode causar infecção crônica nas glândulas mamárias de fêmeas bovinas, mas não há relatos de que possa causar abortos ou que possa haver disseminação para outros animais (OIE, 2017).

Distribuída mundialmente, a brucelose bovina está atualmente presente em 76 países. Em 56 destes a manifestação clínica da doença foi relatada, incluindo Colômbia e Uruguai – onde a enfermidade foi constatada também em animais selvagens. Na Argentina a doença é restrita a algumas zonas. No Canadá, existe suspeita ainda pendente de confirmação em algumas áreas; nos Estados Unidos – declarado livre de brucelose bovina – a enfermidade está limitada a bisões (*Bison bison*) e wapitis (*Cervus canadensis*) na área do Parque Nacional de Yellowstone (WAHIS, 2017).

De uma forma geral, todos os ruminantes são suscetíveis à *B. abortus*, o que é de particular relevância em áreas que adotam programas de erradicação, tendo em vista que mundialmente há diversas notificações da enfermidade em camelídeos como lhamas (*Lama glama*), alpacas (*L. pacos*), guanacos (*L. guanicoe*), vicunhas (*Vicugna vicugna*), dromedários (*Camelus dromedarius*) e camelos (*C. bactrianus*), além de búfalos (*Bubalus bubalis*; *Syncerus caffer*), bisões (*Bison bison*; *B. bonasus*), iaques (*Bos grunniens*), alces (*Cervus elaphus*) e diversas espécies de antílopes africanos. Além da manifestação clínica da brucelose ser semelhante aos bovinos, estas espécies são epidemiologicamente importantes pela possibilidade de se tornarem reservatórios e constantes fontes de infecção em propriedades onde haja compartilhamento de pasto e reservatórios de água (APARICIO, 2013).

Entre 2009 e 2014 foram conduzidos diversos estudos referente à situação epidemiológica da brucelose bovina em 18 estados brasileiros. Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal foram as unidades da federação que apresentaram menor prevalência,

tanto de focos como de animais positivos – 0,32% e 0,06%; 2,1% e 1%; e 2,5% e 0,16%, respectivamente. Na Região Nordeste, destaca-se a baixa prevalência encontrada na Bahia: 4,2% de focos e 0,66% nos animais. Altas prevalências foram encontradas no Mato Grosso (41,2% e 10,2%) e no Mato Grosso do Sul (41,25%). O Quadro 2 apresenta os resultados dos estudos epidemiológicos concluídos até 2016 para brucelose bovina.

Quadro 2 – Prevalência para brucelose nos estados com estudo soropidemiológico completo.

Estado	Prevalência de foco	Prevalência nos animais	Autor
BA	4,2 [3,1-5,3]	0,66 [0,41-0,93]	ALVES et al., 2009
DF	2,5 [1,0-5,1]	0,16 [0,04-0,28]	GONÇALVES et al., 2009a
ES	9,0 [7,0-11,6]	3,5 [1,9-6,4]	AZEVEDO et al., 2009
GO	17,5 [14,9-20,2]	3,0 [2,7-3,3]	ROCHA et al., 2009
MA	11,42 [9,23-14,06]	2,52 [1,73-3,65]	BORBA et al., 2013
MT	41,2 [38,0-44,4]	10,2 [7,4-13,1]	NEGREIROS et al., 2009
MS	41,5 [36,5-44,7]	--	CHATE et al., 2009
MG	6,04 [4,98-7,1]	1,09 [0,78-1,41]	GONÇALVES et al., 2009b
PB	4,6 [3,2-6,5]	2,0 [1,1-3,9]	CLEMENTINO, 2014
PR	4,0 [3,2-4,8]	1,7 [1,1-2,4]	DIAS et al., 2009a
PE	4,5 [2,95-6,14]	1,4 [0,72-2,06]	ALMEIDA, 2013
RJ	15,4 [12,9-17,9]	4,1 [2,8-5,3]	KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009
RS	2,1 [1,5-2,6]	1,0 [0,6-1,4]	MARVULO et al., 2009
RO	35,2 [32,1-38,4] 21,2	6,2 [4,9-7,6]	VILLAR et al., 2009
SC	0,32 [0,10-0,69]	0,06 [0,0-0,99]	SIKUSAWA et al., 2009
SP	9,7 [7,8-11,6]	3,8 [0,7-6,9]	DIAS et al., 2009b
SE	12,6 [9,2-16,0]	3,4 [2,3-4,4]	SILVA et al., 2009
TO	21,2 [19,3-23,1]	4,4 [3,6-5,3]	OGATA et al., 2009

No Maranhão os focos de brucelose estão disseminados por todo o estado. Pesquisa realizada entre setembro de 2007 e março de 2009 por Borba et al. (2013) analisou amostras de 749 rebanhos e de 6779 fêmeas com mais de 24 meses de idade distribuídos em 4 regiões definidas de acordo com o tamanho médio do rebanho, o comércio de animais entre propriedades, o sistema de manejo, incluindo manejo reprodutivo. A prevalência aparente foi estimada em 11,42% entre os rebanhos e 2,5% nos animais. O estado da Bahia, em comparação, com um rebanho bovino cerca de 29% maior (IBGE, 2015), apresentou prevalência de focos de 4,2% e 0,66% em animais (ALVES et al., 2009).

A pesquisa demonstrou que a presença de mais de 54 fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses é o fator de risco com maior associação à condição de foco no Maranhão. Demonstrou ainda que a ocorrência de aborto nos 12 meses anteriores à pesquisa foi relatada

em 18,49% das propriedades amostradas e que 77,29% das propriedades não dão destino a fetos e restos de placenta em caso de aborto no rebanho. O estudo apresenta dados que indicam um frágil controle sanitário do rebanho maranhense. Além da prática da vacinação contra a enfermidade ter sido relatada em apenas 14,61% das propriedades amostradas, observou-se que apenas 17,05% das mesmas possuem assistência veterinária. Concluiu-se ainda que rebanhos com aptidão de corte teriam menos chances de se tornarem focos que aqueles com aptidão leiteira ou mista (BORBA, 2012).

O número de fêmeas na propriedade apresenta-se como um importante fator de risco associado à brucelose bovina em todo o país. Estudo conduzido por Mota et al. (2016) com dados dos inquéritos epidemiológicos realizados em 14 estados brasileiros demonstrou que rebanhos com mais de 400 fêmeas apresentaram risco de infecção superior ao de rebanhos com menor número de fêmeas. A análise demonstrou ainda que propriedades com manejo extensivo e cuja reposição de estoque era realizada por compra direta de animais em outras propriedades ou por meio de vendedores intermediários apresentavam maior risco de infecção. Assim como indicou que o uso exclusivo de inseminação artificial e a assistência veterinária regular podem ser fatores protetivos.

A brucelose pode ser transmitida por contato direto e indireto. Ingestão é a via de entrada mais comum, podendo ocorrer também por via genital e conjuntival, pele e vias respiratórias. A principal fonte de exposição dos bovinos são fetos abortados, placenta e líquidos uterinos após aborto. Além da via uterina, o leite também é fonte de infecção para os bezerros. Pode ocorrer disseminação através do sêmen pelos machos mesmo sem haver lesões nos testículos ou no epidídimo. Moscas do chifre também são capazes de transportar e excretar a bactéria nas fezes (WALKER, 2003).

Brucella exibe forte tropismo tecidual para sistemas linforreticulares e reprodutivos, apresentando estilo de vida intracelular que limita a exposição a respostas inatas e adaptativas, minimizando os efeitos de alguns antibióticos e desencadeando manifestações clínicas e patológicas características. Replica-se nos vacúolos de macrófagos, células dendríticas e trofoblastos. Possui também a habilidade de se replicar em uma vasta gama de células, incluindo migróglia, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (DE FIGUEIREDO et al., 2015).

Fêmeas adultas prenhes infectadas desenvolvem placentite que normalmente resulta em aborto entre o 5º e o 9º mês de prenhez. Mesmo na ausência de aborto, ocorre profusa excreção do agente na placenta, fluidos fetais e descargas vaginais. Também é excretado no

leite, por consequência da infecção das glândulas mamárias e linfonodos associados. Machos adultos podem desenvolver orquite e epididimite. Em países tropicais é comum o aparecimento de higromas nas articulações, podendo até ser o único indicador de infecção, frequentemente com presença da *Brucella* no seu interior. A brucelose é usualmente assintomática em animais jovens e fêmeas não prenhes e pode causar infertilidade tanto nos machos quanto nas fêmeas (OIE, 2017).

Além de prejuízos como abortos, baixas taxas reprodutivas, aumento do intervalo entre partos e mortalidade de bezerros, avalia-se que a brucelose seja responsável ainda por um decréscimo de 20 a 25% na produção de leite e de 10 a 15% na produção de carne (CLEMENTINO & AZEVEDO, 2016). No Brasil, Santos et al. (2013) estimaram as perdas econômicas com a brucelose bovina em R\$ 420,12 (rebanho leiteiro) e R\$ 220,47 (rebanho de corte) por vaca infectada, sendo o custo total anual calculado em aproximadamente R\$ 892,72 milhões, o correspondente a 0,38% do PIB agropecuário do ano de 2013 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2013).

É uma enfermidade facilmente transmissível aos seres humanos, causando uma doença febril aguda que pode evoluir para uma forma mais crônica, podendo causar complicações graves que afetam o aparelho musculoesquelético, cardiovascular e o sistema nervoso central. É considerada uma enfermidade ocupacional, cujo risco é maior para profissionais, médicos veterinários e magarefes que lidam com animais e/ou carcaças infectados e fetos abortados ou placentas (OIE, 2017).

Para prevenir a contaminação de produtos de origem animal, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) previa, já na sua versão original publicada em 1952 (BRASIL, 1952), a condenação total das carcaças com lesões extensas de brucelose. O novo RIISPOA (BRASIL, 2017), em vigor desde março de 2017, determina que as carcaças e os órgãos de animais com sorologia positiva para brucelose devem ser condenadas quando estes estiverem em estado febril no exame ante mortem. Na área de lácteos, o novo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), aprovado em 2016, exige que o leite cru que provém diretamente de propriedades rurais somente poderá ser recebido pela indústria mediante comprovação da regularidade da vacinação do rebanho contra a brucelose (BRASIL, 2016).

Para a população em geral, onde a doença é endêmica, a ingestão de produtos lácteos sem pasteurização constitui o principal risco de contaminação (OIE, 2017). A maior

responsável mundialmente pela brucelose humana é provavelmente a *B. melitensis* (DUCROTOY et al., 2016).

Não existe, entretanto, teste perfeito desenvolvido para o diagnóstico da brucelose. Este deveria ser de fácil execução, robusto, acessível e capaz de identificar todos os indivíduos infectados, diferenciando aqueles que não estão infectados, que foram vacinados ou que mostram anticorpos induzidos por bactérias de reação cruzada. Vale ressaltar que a brucelose é uma enfermidade em que os resultados e a aplicabilidade dos testes diagnósticos são afetados tanto por questões técnicas quanto por complexos fatores biológicos, epidemiológicos e socioeconômicos (DUCROTOY et al., 2016).

Tendo em vista que o quadro clínico não é patognomônico, o diagnóstico definitivo da brucelose só pode ser feito com isolamento e identificação do agente. Entretanto, para uma identificação definitiva é necessária uma combinação de características de crescimento, métodos sorológicos, bacteriológicos ou moleculares. Em situações em que um exame bacteriológico não seja viável (considerando que o manual de biossegurança laboratorial da Organização Mundial da Saúde classifica a *Brucella* no grupo de risco III), o diagnóstico pode ser baseado em métodos sorológicos. Usualmente, as situações de aborto a partir do 5º mês de prenhez em um rebanho devem ser tratadas como suspeita de brucelose e devidamente investigadas (OIE, 2017).

Não há também um teste sorológico único que seja apropriado em todas as situações epidemiológicas. Todos têm limitações, especialmente quando se trata de testes de triagem. Os padrões da OIE para testes sorológicos representam métodos validados com características de desempenho que sejam adequadas para serem utilizados como testes prescritos ou alternativos para o comércio internacional, não excluindo o uso de diferentes reagentes biológicos ou adoção de métodos modificados (RAGAN et al., 2013).

Nas unidades epidemiológicas onde a vacinação é realizada com amostra lisa de *Brucella*, e dependendo do método de vacinação utilizado, podem ocorrer reações sorológicas falso-positivas entre os animais vacinados por reação cruzada com anticorpos induzidos por infecção por cepas selvagens (OIE, 2017).

Além disso, o polissacarídeo-O, presente na membrana externa da *Brucella*, pode ser responsável por reações cruzadas com uma série de outras bactérias, como *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:9 e, menos intensamente, *Escherichia coli* O157 e *Salmonella spp.* grupo N (O:30), capazes de resultar em reações falso-positivas em alguns testes sorológicos.

Vários procedimentos foram desenvolvidos para eliminar aglutininas inespecíficas. Incluem o uso de calor, mercaptanos – como o 2-mercaptoetanol (2-ME) – e pH ácido, bem como EDTA e rivanol. A justificativa para esses tratamentos é seu efeito como desnaturante (calor, pH, mercaptanos) ou de precipitação (rivanol) das IgM (DUCROTOY et al., 2016).

A soroaglutinação sob condições ótimas também pode ser afetada pela existência de anticorpos não-aglutinantes, efeitos pró-zona e reações inespecíficas. Esses três fenômenos desaparecem quase ou totalmente em meio ácido, de modo que os testes de aglutinação de baixo pH foram o suporte de programas de erradicação bem-sucedidos nos EUA e na Europa. No entanto, é assumido na literatura recente e até mesmo em manuais de referência que testes de pH ácido são mais afetados por reações inespecíficas do que outros testes, o que prejudica a implementação de testes simples, baratos e efetivos em áreas onde os recursos são limitados (DUCROTOY et al., 2016).

Os testes sorológicos internacionalmente aceitos para a brucelose bovina, de acordo com os parâmetros descritos no Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, incluem a prova de Rosa Bengala; o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT); o teste de fixação do complemento (FC); ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), tanto indiretos como competitivos; e o teste de polarização fluorescente (FPA). Os três últimos são testes prescritos para fins de comércio internacional (RAGAN et al., 2013; OIE, 2017).

A OIE possui padrões para outros testes que podem ser utilizados para o diagnóstico da brucelose bovina em combinação com testes padronizados aprovados oficialmente. São eles: teste alérgico intradérmico com brucelina; testes de soroaglutinação; testes baseados em proteínas de haptênio e citosol; testes de leite (como ELISA indireto e Ring Test); e o teste de liberação de interferon-gamma. Entretanto, tais testes não são reconhecidos para fins de comércio internacional (RAGAN et al., 2013; OIE, 2017).

Para o controle da brucelose a nível regional ou nacional o teste de Rosa Bengala, o AAT, o ELISA e o FPA são considerados testes de triagem adequados. Dependendo da finalidade do teste, os animais positivos podem ser testados novamente usando um método adequado confirmatório ou complementar (OIE, 2017).

No Brasil, a brucelose bovina é alvo de um programa nacional de controle e erradicação. O PNCEBT, instituído em 2001, nasceu da proposta elaborada por um grupo de trabalho formado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no ano de

2000. Em 2004, foi aprovado o primeiro regulamento técnico do programa, que tem como objetivos reduzir a prevalência e a incidência de casos de brucelose e de tuberculose bovina e bubalina, bem como certificar quantidade significativa de propriedades que possam oferecer ao consumidor produtos de baixo risco sanitário. Até então, o controle da brucelose, regulamentado pela Portaria Ministerial 23/76, não atingia a eficácia desejada em razão da ausência de um programa estruturado que estimulasse os pecuaristas a adotarem ações sanitárias mais adequadas (BRASIL, 2009).

Recentemente o PNCEBT foi revisto pela Instrução Normativa SDA nº 19, de 10/10/2016. A estratégia de atuação do programa quanto à brucelose é baseada na classificação das Unidades da Federação (UF) quanto ao grau de risco para a enfermidade – após realização de inquéritos epidemiológicos – e na definição de procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados de acordo com essa classificação. São também preconizadas um conjunto de medidas sanitárias de adesão compulsória (vacinação de bezerras entre os 3 e 8 meses de idade e controle do trânsito de animais) e voluntárias (certificação de propriedades livres) (BRASIL, 2016).

Os métodos de diagnóstico oficial recomendados no contexto do programa são o AAT como teste de triagem – que pode ser realizado por médicos veterinários habilitados – e a Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL) em conjunto com o 2-ME como teste confirmatório, devendo ser executado em laboratório da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (BRASIL, 2016).

No Brasil é obrigatória ainda a vacinação de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina na faixa etária de 3 a 8 meses utilizando-se dose única de vacina viva liofilizada, elaborada com amostra 19 de *Brucella abortus* (B19). Outrossim, na espécie bovina é facultada a utilização de vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes (amostra RB51), em fêmeas com idade superior a 8 meses e para regularização da situação vacinal de bezerras não vacinadas na faixa etária estipulada pelo programa. Por outro lado, o PNCEBT proíbe a vacinação de fêmeas adultas com a B19 e de machos de qualquer idade com qualquer vacina. Os estados classificados como A – onde a prevalência de focos é menor que 2% – estão excluídos da obrigatoriedade da vacinação contra brucelose (BRASIL, 2016).

Dados oficiais da Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED) mostram que em 2015 foram vacinadas pelos médicos veterinários cadastrados no serviço veterinário estadual 150.656 fêmeas de 12.770 rebanhos em todo o estado. Entre 2010 e 2015 houve um incremento de 20,62% no número de animais vacinados. No mesmo ano, médicos

veterinários habilitados testaram 43.316 animais contra brucelose, 1,51% (656) desses reagentes positivos (MARANHÃO, 2016).

3.2 Diarreia Viral Bovina (BVD)

A Diarreia Viral Bovina (BVD) é uma enfermidade infecciosa causada por um vírus com RNA fita simples senso positivo do gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* com dois genótipos conhecidos: BVDV-1 e BVDV-2; e está sorologicamente relacionado ao vírus da Peste Suína Clássica (CSFV) e ao vírus da Doença da Fronteira (BDV), que acomete ovinos (OIE, 2017).

Além destas 4 espécies reconhecidas dentro do gênero *Pestivirus*, 4 espécies adicionais foram propostas com base na análise filogenética: vírus tipo HoBi (isolado em amostras de soro fetal oriundas do Brasil); Giraffe (isolado de uma das várias girafas no distrito de Nanyuki, Quênia), Pronghorn (isolado de um antílope Pronghorn nos EUA) e Bungowannah (isolado após um surto de doença em suínos na Austrália). Giraffe, Pronghorn e Bungowannah foram isolados de apenas um animal ou durante um surto de doença em uma região geográfica específica. Dentre as 4 novas espécies ainda não caracterizadas, o vírus tipo HoBi é quem particularmente representa maior ameaça para os programas de controle do BVDV e para a vigilância de animais e produtos de origem animal sujeitos ao comércio internacional devido aos relatos de infecção persistente, disseminação aparente em diferentes continentes e detecção em lotes comerciais soro fetal bovino (FBS) (RIDPATH et al., 2013).

O vírus tipo HoBi, também denominado BVDV-3 ou pestivírus atípico, foi identificado pela primeira vez na Europa em 2004, isolado em FBS importado do Brasil. Os vírus do tipo HoBi estão relacionados ao BVDV nos níveis genético e antigênico. Além disso, a doença causada por esses novos vírus assemelha-se a manifestações clínicas historicamente associadas à infecção por BVDV, incluindo retardo de crescimento, redução da produção de leite, doenças respiratórias, redução do desempenho reprodutivo e aumento da mortalidade entre os animais jovens (BAUERMANN et al., 2013).

Considerada uma doença de rebanho, a BVD tem distribuição mundial – pelo menos um dos genótipos já foram isolados em ruminantes de todos os continentes, com exceção da Antártida – e é avaliada como uma das mais importantes causas de perdas econômicas na bovinocultura. Acomete animais de todas as idades e varia de alta morbidade e baixa mortalidade a baixa morbidade e alta mortalidade (STOTT, 2003; RIDPATH, 2010; OIE, 2017).

BVDV de ambos os genótipos podem ocorrer nas formas não-citopáticas e citopáticas (biótipos), classificadas de acordo com a indução ou não de citopatologia aparente microscópica durante a infecção de culturas celulares. Geralmente é o biótipo não-citopático que circula livremente nos rebanhos bovinos. As cepas não-citopáticas são mais frequentemente responsáveis pelas manifestações clínicas nos animais e estão associadas a doenças entéricas e respiratórias em qualquer classe nos bovinos ou doença reprodutiva e fetal após a infecção de uma fêmea reprodutora suscetível (OIE, 2017).

BVD atualmente está presente em 52 países do mundo inteiro. Em 46 destes foi reportada a manifestação clínica da doença, inclusive nos EUA, Canadá, Austrália, México, Argentina, Uruguai e Brasil. Na Itália está restrita apenas em animais silvestres (WAHIS, 2017). Bauermann et al. (2017) encontram nos EUA altos títulos de anticorpos anti-BVDV1 e anti-BVDV2 em 38,5% e 29,7% de 1.968 amostras, respectivamente.

Nos EUA e na Europa, cuja maioria dos países é livre de febre aftosa, o BVDV é considerado o principal agente viral que acomete bovinos, sendo objeto de inúmeros estudos e de programas de controle e/ou erradicação, obtendo sucesso particularmente na Escandinávia (FLORES et al., 2005; RIDPATH, 2010). Inquéritos sorológicos realizados em 9 países africanos registraram a presença de anticorpos anti-BVDV em 17 espécies de animais selvagens, indicando que a infecção é disseminada e sugerindo que tais espécies atuam como reservatórios no ambiente (STOTT, 2003).

No Brasil, cuja presença da infecção foi detectada no final da década de 1960, diferentes estudos sorológicos indicam a ampla disseminação do vírus no rebanho. Apesar disso, tendo em vista a heterogeneidade das amostras estudadas, das técnicas de diagnóstico utilizadas, dentre outros fatores, os índices de positividade observados não devem ser considerados indicadores da presença e prevalência da infecção no rebanho, mas apenas nas respectivas subpopulações pesquisadas (FLORES et al., 2005).

Em 2014, pesquisa conduzida na região Sul do país com amostras de 9.078 bovinos de 6 a 12 meses de idade determinou uma prevalência de 0,36% de infecção nos animais e de 6,9% das 346 propriedades amostradas. Das 33 amostras positivas para BVDV, 57,6% delas mostraram similaridade com o BVDV-1 e 42,4% com o BVDV-2 (WEBER, 2014).

No Maranhão, Chaves et al. (2012) determinaram uma elevada frequência de animais soropositivos em uma amostra de 920 fêmeas de aptidão leiteira não vacinadas contra BVD em 23 municípios de várias regiões do estado. Foram encontradas frequências de

anticorpos de 67,5%, 53,57%, 80%, 63,75% e 74%, para Ilha de São Luís, Imperatriz, Açailândia, Pedreiras e Bacabal, respectivamente. Das 92 propriedades amostradas, 94,57% apresentaram animais reagentes. Dentre os fatores de risco constatados, destacaram-se a ausência de assistência veterinária nas propriedades e o uso de monta natural associada ou não à inseminação artificial (CHAVES et al., 2012).

Mais recentemente, Abas (2014), analisando amostras de 396 bovinos pertencentes a 33 rebanhos do Centro-Leste do estado, encontrou frequência de 90,91% entre os rebanhos e de 54,04% de animais reagentes, concluindo que a presença de suínos nas propriedades estudadas se manifestou como um fator de risco para transmissão do vírus.

Quanto ao vírus tipo HoBi, há relatos da presença em FBS oriundo da Austrália, Canadá, México e EUA, além de já ter sido isolado na Europa e no sudeste asiático. Entretanto, dados não publicados indicam que mais de 30% dos lotes de FBS procedentes da América do Sul que são testados na Europa estão contaminados com vírus tipo HoBi, levando à hipótese de que este vírus provavelmente está espalhado pelo continente sul-americano, especialmente nos rebanhos brasileiros (BAUERMANN et al., 2013; RIDPATH et al., 2013). Em pesquisa realizada na Itália a partir de um banco de amostras de soro oriundas de um rebanho apresentando manifestação clínica respiratória, Decaro et al. (2013) concluíram que o vírus tipo HoBi pode estar circulando na Europa desde antes de 2007. Em 2017, nos EUA, Bauermann et al. encontraram altos títulos de anticorpos contra o vírus tipo HoBi em 13,8% de 1.968 amostras pesquisadas.

A transmissão do BVDV ocorre por contato direto, alimentos, água ou cama contaminados. O vírus tem capacidade de atravessar a placenta e causar teratogênese. A infecção por BVDV resulta em uma grande variedade de manifestações clínicas, incluindo doenças entéricas e respiratórias ou doença reprodutiva e fetal após a infecção de uma fêmea reprodutora suscetível. Embora o termo “diarreia” seja proeminente no nome, são mais comumente relatadas manifestações clínicas respiratórias e reprodutivas associadas à infecção por BVDV (STOTT, 2003; RIDPATH, 2010; OIE, 2017).

A apresentação clínica e a gravidade da doença podem variar com diferentes cepas de vírus e são devidas à infecção direta do feto, sendo o desfecho dependente do estágio de gestação em que ocorre a infecção fetal. Embora os abortos e os bezerros fracos tenham sido atribuídos à infecção por BVDV em gestação tardia, infecções fetais que ocorrem nos primeiros meses da gestação geralmente têm maior impacto na reprodução. Quando ocorre entre 42 e 125 dias de gestação, resultam em reabsorção fetal, mumificação, aborto ou anomalias no

desenvolvimento, como retardo no crescimento uterino, lesões oculares, lesões cerebelares e outras deformidades no sistema nervoso central. A diminuição das taxas de concepção pode ser resultado de morte embrionária precoce ou infertilidade, mas, pelo menos em parte, pode ser causada por alterações na função ovariana (STOTT, 2003; RIDPATH, 2010; NEWCOMER & GIVENS, 2016; OIE, 2017).

Os animais que sobrevivem à infecção transplacentária no primeiro trimestre de gestação quase sempre se tornam persistentemente infectados (PI). Os animais PI são o reservatório principal do vírus em uma população e excretam grandes quantidades de vírus na urina, fezes, descargas nasais, saliva, sangue, leite, sêmen e aerossóis. O BVDV se distribui amplamente nos linfonodos, células epiteliais e linfóides do trato gastrointestinal, pulmões, pele, timo e cérebro (neurônios, astrócitos, oligodendroglia) de animais PI (NEWCOMER & GIVENS, 2016; OIE, 2017).

As infecções agudas primárias de fêmeas prenhes por BVDV são o meio mais comum de produzir bezerros PI, embora as vacas PI (com infecção congênita) também invariavelmente deem origem a bezerros PI. A capacidade de causar infecções do feto é exclusivamente uma propriedade específica do biótipo não-citopatogênico. Após exposição experimental de fêmeas prenhes ao BVDV citopatogênico, foi observado que este raramente causa viremia e infecção transplacentária em comparação com a alta ocorrência de viremia materna e infecção fetal observada com exposição ao BVDV não-citopatogênico (KELLING & TOPLIFF, 2013). Embora alguns animais PI sobrevivam até a idade adulta, estes têm uma taxa de mortalidade maior e tendem a sucumbir para a doença em taxas significativamente mais elevadas que os não-PI (BAUERMANN et al., 2017).

A infecção aguda acontece principalmente em animais mais jovens, podendo ser clinicamente inaparente ou associada à diarreia ou doença respiratória. BVDV também causa imunossupressão, que pode tornar os animais infectados mais suscetíveis à infecção por outros vírus e bactérias. Conseqüentemente, o impacto clínico pode ser mais evidente em rebanhos com manejo intensivo. Animais infectados agudamente excretam níveis relativamente baixos de vírus e por um curto período de tempo (geralmente cerca de 7–10 dias), mas os sinais clínicos podem ocorrer nos até os últimos estágios da viremia, reduzindo o tempo para detectar o vírus, que pode persistir no ambiente por períodos curtos ou ser transmitido com materiais reprodutivos contaminados (STOTT, 2003; RIDPATH, 2010; OIE, 2017).

O reconhecimento de infecções agudas e o diagnóstico da infecção pelo BVDV em materiais reprodutivos podem ser mais difíceis devido, principalmente, ao atraso entre infecção

e manifestação clínica. Em casos de doença respiratória ou entérica as amostras devem ser coletadas de vários animais, selecionando preferencialmente o mais recentemente afetado. Devem ser coletados *swabs* das narinas e da conjuntiva de animais com doença respiratória ou do reto e fezes se houver manifestação entérica. O isolamento do vírus é considerado o teste padrão ouro para o diagnóstico da BVD, apesar de não ser muito prático devido aos baixos níveis do vírus. Por outro lado, o RNA viral pode ser detectado por ensaios RT-PCR em tempo real e tem as vantagens de alta sensibilidade e capacidade de detectar genoma de vírus não infecciosos (LANYON et al., 2014; NEWCOMER & GIVENS, 2016; OIE, 2017).

A confirmação de que um aborto, morte fetal ou morte perinatal é causada por BVDV é muitas vezes difícil de ser estabelecido uma vez que pode haver um longo atraso entre a infecção inicial e morte ou expulsão do feto. A amostragem deve levar em consideração a necessidade de detectar componentes virais ou anticorpos. O baço e o pulmão são amostras de eleição para detecção de vírus, enquanto os fluidos pericárdicos ou pleurais são amostras ideais para sorologia nesses casos. Embora o vírus possa ser isolado do tecido fetal e, particularmente, da placenta, deve-se enfatizar a detecção de antígeno viral por ELISA ou do RNA por RT-PCR em tempo real (NEWCOMER & GIVENS, 2016; OIE, 2017).

No passado, a identificação dos animais PI dependia fortemente do isolamento do vírus em culturas celulares. No entanto, ensaios ELISA de detecção de antígenos e os ensaios RT-PCR em tempo real, cada um com sensibilidade relativamente alta, têm sido amplamente utilizados para a detecção de antígenos virais ou RNA em animais vivos e mortos. O advento do diagnóstico molecular permitiu que testes de amostras individuais reunidas em um *pool* sejam utilizadas para se detectar a presença de animais PI no grupo testado (NEWCOMER & GIVENS, 2016; OIE, 2017).

Usando RT-PCR, o teste de um *pool* de amostras de sangue ou de pele – por meio de biópsia da orelha – fornece uma ferramenta de vigilância rápida e econômica para BVDV. O recurso da biópsia de pele tem o benefício de ser menos invasivo, além das amostras individuais que compõem um *pool* positivo poderem ser posteriormente analisadas para identificar o indivíduo PI dentro do grupo. *Pool* de até 100 amostras demonstraram alta sensibilidade na detecção de animais PI. Quando a prevalência local da enfermidade é alta, reunir um menor número de amostras no *pool* torna-se mais econômico devido à necessidade de testar as amostras individuais subsequentes. Nos surtos de grande escala com muitos animais PI, o vírus pode ser identificado na pele de animais infectados por até 120 dias. Nessas situações, é aconselhável usar diferentes metodologias durante um longo período para identificar com

precisão quais animais são PI e que estão infectados de forma transitória (BRODERSEN, 2014; NEWCOMER & GIVENS, 2016; OIE, 2017).

Amostras de leite individuais ou em conjunto (tanque) também são utilizadas com sucesso para monitorar rebanhos leiteiros para a presença de um animal PI através de ELISA direto, RT-PCR em tempo real e isolamento de vírus. A combinação entre RT-PCR e isolamento viral aumenta a sensibilidade da detecção, mas acrescenta custos e atraso nos resultados do ensaio. Os testes baseados em RT-PCR são sensíveis o suficiente para identificar uma única amostra de animal PI diluída no tanque com leite de um conjunto de 600 animais. Para confirmar o diagnóstico de infecção persistente, os animais devem ser reanalisados após um intervalo de pelo menos 3 semanas (NEWCOMER & GIVENS, 2016; OIE, 2017).

A sorologia pode ser usada para identificar níveis de imunidade do rebanho, para auxiliar na investigação de doenças reprodutivas com possível envolvimento de BVDV e para identificar uma recente infecção no rebanho. Anticorpos anti-BVDV podem ser pesquisados utilizando-se tanto ELISA indireto quanto soro-neutralização (SN) do vírus, embora a qualidade da amostra e possível contaminação bacteriana possam comprometer a capacidade de detectar anticorpos pela SN. Enquanto a SN é mais frequentemente utilizada para fins regulatórios – como, por exemplo, para testar doadores de sêmen –, o ELISA indireto é o teste mais recomendado quando a finalidade é dar suporte a programas de erradicação da enfermidade, determinar a prevalência de focos e animais nos trabalhos de vigilância ativa e determinar uma população como livre do vírus (OIE, 2017).

A sorologia pareada realizada em amostras coletadas nos estágios iniciais da infecção e pelo menos 21 dias após a fase aguda oferece alta probabilidade de confirmar ou excluir a infecção por BVDV. No entanto, como amostras coletadas durante o período de viremia aguda são muitas vezes difíceis de obter, testes em série com altos títulos de anticorpos após a fase aguda, detectados por SN ou ELISA, podem sugerir que a infecção aguda ocorreu nas 10–12 semanas anteriores (LANYON et al., 2014; OIE, 2017).

Apesar do ELISA indireto não ser o método indicado para se detectar a presença de animais PI em um rebanho, um alto valor de absorbância ($\geq 0,8$) em um rebanho não vacinado indica uma alta probabilidade deste ter sido exposto ao BVDV em um passado recente, provavelmente através de um ou mais animais PI. Em contrapartida, um valor muito baixo ou negativo ($\leq 0,2$) indica que é improvável que os animais PI estejam presentes (OIE, 2017).

Com o entendimento de que os indivíduos PI são a principal fonte de transmissão do BVDV, esses animais se tornam naturalmente o alvo dos programas de controle e erradicação da doença. Programas de identificação e abate de animais PI foram aplicados com sucesso em muitos países, tais como Áustria, Escócia, Holanda, Noruega, Dinamarca, Suécia, Suíça, Itália, Eslovênia, Alemanha, França, Irlanda e Finlândia (BRODERSEN, 2014; LANYON et al., 2014).

Eliminar a circulação do vírus evitando a entrada de animais BVDV-positivo, fornecendo imunidade através de vacinação e descartando os animais PI é a forma mais rápida e segura para livrar um rebanho da BVD. A definição de estações de monta propicia o controle de BVDV ao permitir maior efetividade na imunização, coleta de amostras para testes diagnósticos e abate de animais PI, além de mitigar os efeitos reprodutivos do BVDV, permitindo a introdução de animais de reposição de rebanhos em período reprodutivo menos crítico. O impacto econômico das consequências reprodutivas negativas da BVD dependerão do estágio reprodutivo e do estado imune do rebanho de criação no momento da exposição ao vírus (RODNING et al., 2012).

3.3 Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) é uma enfermidade infecciosa causada pelo Alphaherpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1), anteriormente denominado Herpesvirus Bovino tipo 1 (ICTV, 2015), do gênero *Varicellovirus*, da subfamília *Alphaherpesvirinae*, da família *Herpesviridae*, da ordem Herpesvirales, que pode se apresentar como doença ocular, genital e respiratória e que tem como hospedeiros principais os bovinos. Tipicamente, apresenta-se como rinotraqueíte, que pode evoluir para broncopneumonia grave e frequentemente fatal. Pode infectar os órgãos genitais, causando abortos, balanopostite e vulvovaginite (ARDANS, 2003; OIE, 2017).

BoHV-1 pode ser diferenciado em subtipos 1.1, 1.2a e 1.2b. Os subtipos BoHV-1.2 podem ser menos virulentos do que o subtipo 1.1. O antigo BoHV-1.3, que atua como agente da meningo-encefalite herpética, foi reclassificado como BoHV-5. A espécie bovina também é hospedeira natural ou pode ser infectada naturalmente por alphaherpesvírus pertencentes a outros gêneros e a outras subfamílias, como o alphaherpesvirus bovino tipo 2 (BoHV-2, do gênero *Simplexvirus*, agente da mamilitite herpética), o gammaherpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2) e o gammaherpesvirus alcelafino tipo 1 (AIHV-1), ambos do gênero *Macavirus*, da subfamília *Gammaherpesvirus*. O OvHV-2 e AIHV-1 são os agentes etiológicos da febre catarral maligna (MCF). O AIHV-1 acomete bovinos, cervídeos e outros ruminantes no

continente africano, enquanto o OvHV-2 é o agente da MCF associada com ovinos, doença que acomete bovinos e outros ruminantes (FRANCO & ROEHE, 2007; OIE, 2017).

BoHV-1 foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1956. A partir de então, inúmeros estudos têm revelado a sua ampla distribuição. A IBR está presente em 57 países em todos os continentes, inclusive EUA, Canadá, Austrália, Argentina, Uruguai e Brasil e é objeto de diversas campanhas de erradicação em diferentes regiões. No México, está restrita a algumas regiões. Alguns países europeus, como a Dinamarca e a Finlândia, conseguiram erradicar a infecção. (FRANCO & ROEHE, 2007; OIE, 2017; WAHIS, 2017).

No Brasil, o BoHV-1 foi isolado, pela primeira vez, de um caso de vulvovaginite na Bahia, em 1978 (FRANCO & ROEHE, 2007). De acordo com recente revisão bibliográfica, o vírus está disseminado em todas as regiões, com taxas de prevalência variando de 56 a 96% na região Nordeste, 51,9% a 83% no Centro Oeste, de 14,2 a 87,3% em Minas Gerais e de 18,8 e 64,41% na região Sul (FINO et al., 2012). Mais especificamente em Pernambuco, Silva et al. (2015) observaram 79,5% em 380 amostras de soro bovino. Viana et al. (2016) detectaram frequência de 85% em amostras de 214 búfalos coletadas no estado do Pará.

No Maranhão, a pesquisa mais recente realizada em bovinos estabelece que a frequência de anticorpos contra o BoHV-1 é alta, com taxas variando entre 48,91% a 80,44% em amostras colhidas de 1.104 fêmeas de 48 rebanhos de corte – todos apresentando pelo menos 5 animais reagentes (21,74% a 95,65%) – em 12 municípios da microrregião de Imperatriz (FREITAS et al., 2014). Carvalho et al. (2015), em pesquisa realizada com búfalos no município de São Mateus – MA, identificou a ocorrência do BoHV-1 em 87,25% dos animais avaliados.

Anteriormente, na região amazônica maranhense, Bezerra et al. (2012) detectaram uma prevalência de 69,25% em fêmeas de aptidão leiteira. Um dos fatores de risco associado à infecção pelo BoHV-1 foi a ausência de assistência veterinária. Fino et al. (2012), indica que o constante ingresso de bovinos de diferentes origens, a presença de animais mais velhos, a aptidão leiteira e o maior número de cabeças por rebanho também são fatores de risco associados ao BoHV-1. A criação consorciada de caprinos/ovinos com bovinos também deve considerada como fator de risco, conforme concluíram estudos conduzidos por Freitas et al. (2014) e Silva et al. (2015).

A forma natural de entrada do BoHV-1 nos hospedeiros é através das mucosas do aparelho respiratório cranial, do epitélio conjuntival e dos órgãos genitais. O contato direto das regiões nasais entre os animais é a principal via de transmissão do vírus, podendo ocorrer

também por meio de aerossóis a curtas distâncias. A infecção genital pode ocorrer através de monta natural e/ou inseminação artificial, particularmente por meio de sêmen contaminado ou de transferência de embriões. A transmissão também pode ocorrer por ingestão de água e alimentos contaminados, além da coleta de sêmen com vaginas artificiais contaminadas (FRANCO & ROEHE, 2007; COSTA et al., 2017).

Após a infecção via aérea, o vírus replica-se a títulos elevados nas mucosas do trato respiratório superior e nas amígdalas. Posteriormente, o vírus se dissemina na conjuntiva e atinge os gânglios trigeminais via fluxo axonal retrógrado. Após a infecção genital, o BoHV-1 se replica nas mucosas da vagina ou no prepúcio e torna-se latente nos gânglios sacrais. O DNA viral permanece nos neurônios dos gânglios, provavelmente por toda a vida do hospedeiro. Condições de estresse, como transporte, desmame, parto e carências nutricionais graves, bem como administração de drogas imunossupressoras, podem induzir a reativação da infecção latente. Conseqüentemente, o vírus pode alternar entre infecção latente e lítica, fazendo com que o hospedeiro excrete intermitentemente partículas virais infectantes no ambiente capazes de se disseminar pelo contato entre os animais (FRANCO & ROEHE, 2007; COSTA et al., 2017; OIE, 2017).

Surtos naturais simultâneos de doença respiratória e genital são raros. A forma genital manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de pequenas vesículas que evoluem para pústulas e erosões na vulva, no vestíbulo da vagina e na vagina, apresentando epitélio edemaciado, hiperêmico e com secreção que pode tornar-se mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária. O BoHV-1 pode também originar lesões necrosantes nos ovários, principalmente se a infecção ocorrer no período da ovulação. O vírus frequentemente provoca aborto, variando o período de incubação entre infecção da mãe e morte fetal entre 5 a 60 dias (ARDANS, 2003; COSTA et al., 2017).

Lesões similares às descritas acima são encontradas no prepúcio e pênis de touros infectados. Considerando que o sêmen é contaminado apenas durante a ejaculação, o vírus não é excretado de forma uniforme ou contínua por machos soropositivos. Logo, nem todas as amostras de sêmen de um touro portador terão vírus suficientes para infectar uma fêmea. Inseminação do rebanho com sêmen infectado pode resultar em endometrite, diminuição da concepção e período estral encurtado (ARDANS, 2003; COSTA et al., 2017; FRANCO & ROEHE, 2007). Por outro lado, experimento conduzido por Del Fava (2001) demonstrou que fêmeas de corte não vacinadas, infectadas pelo BoHV-1, podem apresentar parâmetros reprodutivos satisfatórios quando criadas em adequado sistema de manejo.

Surtos de IBR são mais frequentemente observados em animais jovens e estão geralmente associados com situações de estresse e aglomeração de animais, incluindo eventos de transporte e confinamento. Outros agentes virais e bacterianos podem estar associados com o BoHV-1 nesses episódios de doença respiratória, genericamente chamados de “complexo respiratório de bovinos”. Os patógenos comumente associados são o BVDV, o vírus da parainfluenza 3 (bPI-3V) e o vírus respiratório sincicial (BRSV), além de pasteurelas (FRANCO & ROEHE, 2007).

A infecção de fêmeas soronegativas gestantes com amostras virais de alta virulência (BoHV-1.1 ou 1.2a), pode resultar em abortos, que ocorrem principalmente entre o quinto e oitavo mês da gestação. Os abortos ocorrem geralmente após um período de incubação de três a seis semanas, durante o qual o vírus alcança o feto durante a viremia (FRANCO & ROEHE, 2007).

A infecção por BoHV-1 pode ser suspeitada com base em achados clínicos, patológicos e epidemiológicos. No entanto, para fazer um diagnóstico definitivo, são necessários exames sorológicos. Para um diagnóstico completo, recomenda-se o isolamento viral ou de componentes virais, bem como a pesquisa de anticorpos específicos. No entanto, a detecção de anticorpos pode ser suficiente para a determinação do estado sanitário individual dos animais individuais devido à infecção latente induzida pelo BoHV-1 (OIE, 2017).

Um diagnóstico rápido pode ser realizado por imunofluorescência (IFA) com anticorpos específicos em cortes ou impressões de tecidos, bem como em esfregaços de secreções. Nesses casos, o resultado pode ser obtido dentro de uma a duas horas. Usualmente, além da IFA, suspensões de tecidos ou secreções são preparadas e inoculadas em cultivos celulares, visando ao isolamento do agente. Podem ser utilizadas células bovinas de várias origens, tais como cultivos primários ou secundários dos rins, pulmões ou testículos, assim como as estirpes celulares derivadas do pulmão fetal bovino, da concha nasal ou da traquéia. Cultivos primários são mais sensíveis para o isolamento viral do que linhagens contínuas. Entretanto, em razão de maior praticidade, células de linhagem – como, por exemplo, as MDBK – são as mais utilizadas para o isolamento viral (FRANCO & ROEHE, 2007; OIE, 2017).

A identificação do DNA do BoHV-1 por meio da PCR apresenta vantagens relacionadas a sensibilidade e especificidade, bem como na praticidade e rapidez de resultados. A PCR também possibilita a amplificação de segmentos do genoma viral diretamente das amostras clínicas utilizadas para o diagnóstico. Entretanto, a PCR tem aplicação restrita para o diagnóstico de infecções agudas pelo BoHV-1. Na fase de latência viral, a PCR não é capaz de

detectar o vírus em amostras que não se originam dos sítios de latência. A PCR também tem sido utilizada com eficiência na detecção de baixa concentração viral em embriões e fluidos uterinos, o que nem sempre é possível de ser detectado pelo método de isolamento. (FRANCO & ROEHE, 2007; COSTA et al., 2017).

Testes sorológicos podem ser utilizados como suporte à investigação clínica, sendo amplamente utilizados em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos, triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen e para demonstrar ausência de infecção, por exemplo, para fins de comércio internacional. Para o diagnóstico da infecção aguda devem ser coletadas amostras de soro pareadas dos mesmos animais na fase aguda e na convalescência da infecção. Uma soroconversão de negativo para positivo ou um aumento de quatro vezes ou mais em títulos de anticorpos é considerada prova de uma infecção aguda (FRANCO & ROEHE, 2007; OIE, 2017).

Os testes de SN e ELISA são os usualmente utilizados para detectar anticorpos contra BoHV-1 no soro. Ambos são altamente sensíveis e podem oferecer também resultados quantitativos. Como a latência é uma sequela normal da infecção pelo vírus, a identificação de animais sorologicamente positivos fornece um indicador útil e confiável do estado da infecção. Animal positivo nunca vacinado contra o BoHV-1 e fora do período de 6 meses da imunidade passiva pode ser considerado portador crônico do vírus (COSTA et al., 2017; OIE, 2017).

As medidas de controle em relação ao BoHV-1 devem ser relacionadas com a severidade da infecção no rebanho, práticas de manejo e com a prevalência da infecção. Em geral, podem ser adotadas duas principais estratégias de controle, de acordo com a situação epidemiológica e histórico clínico dos rebanhos: controle com ou sem vacinação. Rebanhos com histórico comprovado da infecção, com sorologia elevada, sistemas de recria e confinamento que agregam novilhos de várias procedências, além de propriedades com alta rotatividade de animais são recomendados a implementar a vacinação. Nessas situações, a vacinação contínua e regular pode reduzir a circulação de vírus e a ocorrência de doença clínica, reduzindo, conseqüentemente, as perdas econômicas (FRANCO & ROEHE, 2007).

Em rebanhos de baixo risco, sem histórico da enfermidade/infecção ou sem sorologia positiva devem ser implementadas medidas de biossegurança para evitar a introdução da infecção. Nesses casos, o teste de qualquer animal a ser incorporado ao rebanho, bem como o teste de sêmen e reprodutores, aliados a testes sorológicos periódicos e descarte de eventuais positivos, são, em geral, métodos efetivos. Rebanhos com sorologia alta, mas sem histórico clínico de doença respiratória ou genital, e sem problemas reprodutivos podem ser mantidos

sem vacinação, porém com monitoramento contínuo dos parâmetros produtivos e clínicos (FRANCO & ROEHE, 2007).

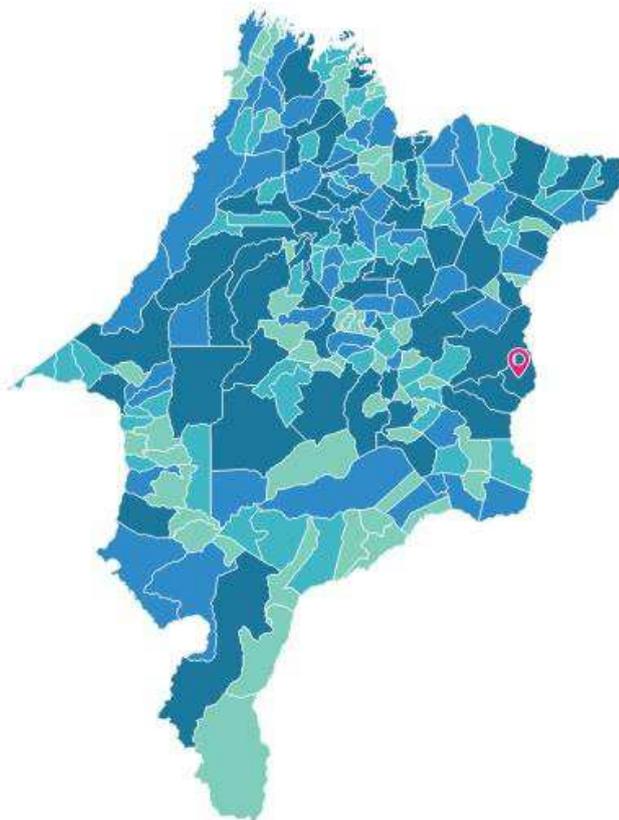
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

A pesquisa foi conduzida em um abatedouro frigorífico registrado no SIF localizado no município de Timon (MA). O estabelecimento foi selecionado considerando possuir a maior capacidade diária de abate dentre os frigoríficos instalados no MA (1160 animais/dia), por ter concentrado 38,97% dos bovinos abatidos em todo o estado no ano de 2014 e por abater animais oriundos de todas as Macrorregiões estaduais, conforme dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SIGSIF, 2017).

O município de Timon fica localizado à margem esquerda do rio Parnaíba. A sede do município localiza-se a 5°5' de latitude sul e 42°50' de longitude oeste, estando 69 m acima do nível do mar, distante 446 km de São Luís por rodovia. Está situado na Microrregião geográfica de Caxias, Mesorregião do Leste Maranhense, limitando-se ao leste com Teresina, capital do Piauí, ao norte e ao oeste com o município de Caxias (MA), e ao sul com o município de Matões (MA) (IBGE, 2015).

Figura 1 - Mapa político e divisões municipais do estado do Maranhão. Fonte: IBGE, 2015.



4.2 Delineamento amostral

Foi calculada, com base na fórmula de Callegari-Jacques (2007), a necessidade de coletar amostras de 974 animais. Levou-se em consideração o tamanho da população ($N = n^\circ$ de fêmeas abatidas no estabelecimento em 2014, ano imediatamente anterior ao início da pesquisa: 7.884), o erro amostral tolerável ($E_0 = 3\%$) e a estimativa do tamanho da amostra (n_0), onde:

$$n_0 = \frac{1}{(E_0)^2}$$

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

4.3 Colheita das amostras

Tendo em vista a diminuição do abate em 7,5% no ano de 2015 e 18,99% em 2016, foram coletadas 650 amostras de sangue em duplicata de fêmeas bovinas de corte de 14 lotes aleatórios oriundos de municípios do estado do Maranhão, conforme programação de abate do estabelecimento, sem interferência do autor, entre julho de 2015 e junho de 2016, distribuídas conforme o quadro 3. Cada lote contém animais de uma única propriedade rural.

Quadro 3 – Número de amostras coletadas por lote e município de origem.

Lote	Nº de cabeças	Município de origem
1	100	Parnarama
2	20	Tuntum
3	21	Vitorino Freire
4	121	Passagem Franca
5	80	Colinas
6	40	Bom Lugar
7	40	Cidelândia
8	21	Presidente Dutra
9	24	Lagoa Grande do Maranhão
10	68	Caxias
11	60	Caxias
12	20	Grajaú
13	13	Timon
14	22	Santa Luzia
Total	650	

Considerando a limitação de recursos para aquisição dos kits de ELISA, tanto para o diagnóstico de BVDV quanto para o de BoHV-1 foram utilizadas apenas 364 das 650 coletadas. Convencionou-se utilizar para estes testes o máximo de 35 amostras por lote, selecionadas através de sorteio. Lotes com menos de 35 amostras coletadas foram analisados na íntegra. Foram analisados apenas 13 dos 14 lotes.

4.4 Processamento das amostras

O sangue foi coletado em tubos plásticos durante a sangria dos animais na sala de abate do estabelecimento. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente com os tubos em posição inclinada, até a coagulação, retração do coágulo e liberação do soro. Posteriormente, foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão.

No laboratório, após centrifugação a 2.000 rpm por 15 minutos, as alíquotas de soro foram transferidas para microtubos de plástico do tipo Eppendorf®, identificadas individualmente, separadas por número de lote e data de coleta, e acondicionadas a uma temperatura de -20°C até o momento de realização dos testes sorológicos.

4.5 Técnicas de Diagnóstico

4.5.1 *Brucella abortus*:

4.5.1.1 AAT (BRASIL, 2009):

As 650 amostras de soro e o antígeno foram equilibrados à temperatura ambiente por 30 minutos. Utilizando-se o micropipetador, foram dispensados 30 μl soro e antígeno lado a lado em cada área demarcada da placa. Em seguida, soro e o antígeno foram misturados com movimentos circulares e a placa agitada continuamente por 4 minutos com movimentos oscilatórios. Após o tempo determinado, a placa foi colocada na caixa de leitura com luz indireta e realizou-se a leitura:

- a) Presença de grumos: REAGENTE;
- b) Ausência de grumos: NÃO-REAGENTE.

Animais reagentes foram submetidos ao teste 2-ME.

4.5.1.2 SAL e 2-ME (BRASIL, 2009):

Após a diluição do antígeno para soroaglutinação lenta em tubos em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol e diluição do antígeno para a prova de 2-ME em solução salina a 0,85% sem adição de fenol, foi preparada solução de 2-ME a 0,1M misturando-se 7,8 ml de 2-ME a 992,20 ml de solução salina a 0,85% sem fenol.

Para cada amostra de soro testado foram organizadas em estantes duas fileiras (identificadas como T e M) de quatro tubos com o primeiro tubo de cada fileira identificado com o número correspondente à amostra. Com uma pipeta de Bang, foram depositados 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml e 0,01 ml de soro no fundo de cada tubo de cada uma das fileiras. Em seguida, foram incluídos os soros controle positivo e negativo e adicionou-se a cada um dos quatro tubos das fileiras T 2 ml do antígeno diluído 1:100 em solução salina fenicada e 1 ml de solução de 2-ME 0,1M a cada um dos tubos das fileiras M.

Após misturar o conteúdo dos tubos agitando a estante, as amostras foram deixadas em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se a cada tubo da fileira M, 1 ml do antígeno diluído a 1:50 em solução salina (sem fenol), mais uma vez agitando-se a estante em seguida.

Depois de incubar a 37°C por 48h, a leitura da prova foi feita por meio de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco. As interpretações basearam-se no grau de turvação dos tubos e na firmeza dos grumos após agitação suave dos tubos. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram formação de grumos em qualquer das titulações utilizadas (1/25, 1/50, 1/100 e 1/200).

4.5.2 BVDV

4.5.2.1 ELISA indireto (OIE, 2017):

Foi utilizado o kit comercial IDEXX BVDV Total Ab. Antes da prova, todos os reagentes foram equilibrados à temperatura entre 18 e 26°C antes do uso e homogeneizados por vórtex. Após anotar-se a posição das 364 amostras, foram adicionados 100 µl de diluente de amostra em cada poço. Em seguida, adicionou-se 25 µl de controle negativo e 25 µl de controle positivo nas cavidades apropriadas e 25 µl das amostras de soro nas cavidades remanescentes. Posteriormente, após agitar levemente a placa com o auxílio de um agitador para placas de microtitulação, as amostras foram incubadas por 90 minutos.

Depois de desprezar o conteúdo líquido em reservatório apropriado, cada poço foi lavado com 300 μ l de solução de lavagem por 5 vezes. Em seguida, adicionou-se 100 μ l de conjugado em cada cavidade. Após nova incubação por 30 minutos, repetiu-se o procedimento de lavagem dos poços. Adicionando-se 100 μ l de substrato TMB nº 12 em cada cavidade, deixou-se incubar por mais 10 minutos no escuro. Concluída a última incubação, 100 μ l de solução de interrupção nº 3 foram adicionados em cada cavidade na mesma ordem em que a solução de substrato foi adicionada.

Antes da leitura de cada placa, o espectrofotômetro foi calibrado com ar, anotando-se a absorbância das amostras e controles a 450 nm. Os resultados foram calculados através do software xChek™ Assay Management System, versão 3.3, sob licença da IDEXX Laboratories, Inc.

A leitura espectrofotométrica das placas de ELISA foi realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico da UEMA.

4.5.3 BoHV-1

4.5.3.1 ELISA indireto (OIE, 2017):

Foi utilizado o kit comercial IDEXX IBR gB X3 Ab. Os reagentes foram preparados como já descrito no item anterior.

Após anotar-se a posição das 364 amostras, foram adicionados 50 μ l de solução de lavagem diluída em cada poço. Em seguida, adicionou-se 50 μ l de controle negativo e 50 μ l de controle positivo nas cavidades apropriadas e 50 μ l das amostras de soro nas cavidades remanescentes. Posteriormente, após agitar levemente a placa com o auxílio de um agitador para placas de microtitulação, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C.

Depois de desprezar o conteúdo líquido em reservatório apropriado, cada poço foi lavado com 300 μ l de solução de lavagem por 5 vezes. Em seguida, adicionou-se 100 μ l de conjugado em cada cavidade. Após nova incubação por 1 hora, repetiu-se o procedimento de lavagem dos poços. Adicionando-se 100 μ l de substrato TMB nº 12 em cada cavidade, deixou-se incubar por mais 10 minutos no escuro. Concluída a última incubação, 100 μ l de solução de interrupção nº 3 foram adicionados em cada cavidade na mesma ordem em que a solução de substrato foi adicionada.

Antes da leitura de cada placa, o espectrofotômetro foi calibrado com ar, anotando-se a absorbância das amostras e controles a 450 nm. Os resultados foram calculados através do

software xChek™ Assay Management System, versão 3.3, sob licença da IDEXX Laboratories, Inc.

A leitura espectrofotométrica das placas de ELISA foi realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico da UEMA.

4.6 Análise de dados

Após a realização dos testes sorológicos, foram estimadas as prevalências aparente e verdadeira de cada agente estudado através da ferramenta Epitools by Ausvet© (SERGEANT, 2017) e utilizado o teste do Qui Quadrado para comparar a significância entre os resultados de cada lote. O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 1% ($p < 0,01$), obtendo-se intervalos de confiança de 99%.

Foi utilizado o método descrito por Brown et al. (2001) para o cálculo do intervalo de confiança da prevalência aparente. A prevalência verdadeira estimada foi calculada conforme Rogan & Gladen (1978) levando-se em consideração a sensibilidade e especificidade de cada teste diagnóstico. Foi utilizada a fórmula descrita por Greiner & Gardner (2000) como método de cálculo de aproximação normal.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 650 amostras analisadas, 8,62% (56/650) reagiram ao AAT e foram submetidas ao 2-ME. Somente 1,23% das amostras (8/650) de 35,71% dos lotes (5/14) resultaram positivas para Brucelose. Destas, 50% pertenciam ao lote 8, proveniente do município de Presidente Dutra, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 – Prevalência aparente de fêmeas bovinas de corte soropositivas para brucelose bovina em lotes destinados ao abate.

Lote	N	Animais		Prevalência aparente (%)	IC 99% (%)	Município de origem
		AAT Positivo	2-ME Positivo			
1	100	8	0	0,00	–	Parnarama
2	20	3	0	0,00	–	Tuntum
3	21	2	0	0,00	–	Vitorino Freire
4	121	10	1	0,83	[0,00 – 2,95]	Passagem Franca
5	80	3	0	0,00	–	Colinas
6	40	8	0	0,00	–	Bom Lugar
7	40	3	1	2,50	[0,00 – 8,86]	Cidelândia
8	21	6	4	19,05	[0,00 – 41,12]	Presidente Dutra
9	24	2	0	0,00	–	Lagoa Grande do Maranhão
10	68	3	1	1,47	[0,00 – 5,23]	Caxias
11	60	3	0	0,00	–	Caxias
12	20	1	1	5,00	[0,00 – 17,55]	Grajaú
13	13	1	0	0,00	–	Timon
14	22	3	0	0,00	–	Santa Luzia
Total	650	56	8	1,23	[1,2 – 2,34]	

A prevalência verdadeira estimada para brucelose foi calculada levando-se em consideração 93,3% de sensibilidade e 91,1% de especificidade do 2-ME (SOUZA, 2014). Entretanto, 3 dos 4 lotes positivos resultaram em valores negativos.

Nota-se na tabela acima que a prevalência aparente de brucelose entre os animais (1,23%) se apresentou mais baixa que a encontrada em estudos anteriores. Carvalho et al. (2016) encontraram 3,23% (17/525) de prevalência em bovinos de municípios da regional de Pedreiras; Borba et al. (2013), 2,5% (112/6779) em fêmeas com idade \geq a 24 meses em todo o estado; e Santos et al. (2007), 9,91% (23/232) em fêmeas abatidas em matadouro registrado na inspeção municipal de São Luís.

Tais diferenças podem ser explicadas considerando que os animais testados no presente estudo eram provenientes exclusivamente de rebanhos de aptidão de corte, identificada por Borba (2012) como um fator protetor para a enfermidade, enquanto a amostra obtida por

Carvalho et al. (2016) era formada apenas por animais de aptidão leiteira e a de Borba et al. (2013) formada por animais pertencentes a rebanhos de corte, leite e misto. Além disso, conforme dados da AGED (MARANHÃO, 2016), houve um aumento de 20,62% no número de animais vacinados entre 2010 e 2015, o que indica um avanço no controle da brucelose bovina no estado.

Quanto à diferença em relação à prevalência encontrada por Santos et al. (2007), deve-se levar em consideração que o estado sanitário das fêmeas encaminhadas ao abate em estabelecimentos sob inspeção federal nos dias atuais não é o mesmo que o das encaminhadas aos estabelecimentos sob inspeção municipal no município de São Luís durante a década passada, que notoriamente se caracterizavam por serem provenientes de lotes de descarte.

Viana et al. (2010), ao estudarem amostras de soro de 845 bovinos (836 fêmeas) em um abatedouro frigorífico sob inspeção federal no TO, encontraram 16,6% (93/561) de prevalência entre animais provenientes do PA e 17,2% (49/284) entre os oriundos do próprio estado. Em PE, Rolim et al. (2013) encontraram prevalência igual a 0,0% para brucelose dentre 412 amostras de soro de touros abatidos em um matadouro público do estado.

Ao analisarmos cada lote individualmente, dois dados chamam a atenção: a alta prevalência encontrada no lote 8, bem como os resultados distintos entre dois lotes (10 e 11) oriundos do município de Caxias. Deve ser considerado, no caso do lote 8, que o tamanho da amostra ($n=21$) influenciou diretamente no intervalo de confiança (IC) calculado e que, estatisticamente, tal resultado poderia ser igual a zero. No caso dos lotes 10 e 11, além da mesma questão relacionada ao IC, a disparidade entre os resultados pode ser explicada por possíveis diferenças no manejo sanitário de cada propriedade, bem como ao histórico de vacinação dos rebanhos, o que enseja estudos posteriores para confirmação, considerando que não foram obtidas tais informações.

Das amostras analisadas para BVDV, 65,66% (239/364) foram positivas. Para BoHV-1, 85,99% (313/364) reagiram positivamente. Como se pode observar nas tabelas 2, 3, 4 e 5, os resultados da sorologia para o BVDV e o BoHV-1 foram bastante distintos em comparação aos resultados para a brucelose. Todos os 13 lotes analisados apresentaram animais positivos para ambos os patógenos. A prevalência verdadeira estimada para o BVDV e o BoHV-1 foi calculada levando-se em consideração a especificidade e a sensibilidade informada nos kits de ELISA IDEXX BVDV Total Ab (99,5% e 96,3%, respectivamente) e IDEXX IBR gB X3 Ab (99,8% e 100%, respectivamente).

Conforme as tabelas 2 e 3, evidencia-se que o lote 12, de animais oriundos do município de Grajaú, foi o único que apresentou baixa prevalência para BVDV.

Tabela 2 – Prevalência aparente de fêmeas bovinas de corte soropositivas para BVDV em lotes destinados ao abate.

Lote	N	BVDV Positivo	Prevalência aparente (%)	IC 99% (%)	Município de origem
1	35	31	88,57	[74,72 – 100]	Parnarama
2	20	10	50,00	[21,2 – 78,8]	Tuntum
3	21	14	66,67	[40,17 – 93,16]	Vitorino Freire
4	35	17	48,57	[26,81 – 70,33]	Passagem Franca
5	35	32	91,43	[79,24 – 100]	Colinas
6	35	27	77,14	[58,86 – 95,43]	Bom Lugar
7	35	15	42,86	[21,31 – 64,4]	Cidelândia
8	21	20	95,24	[83,27 – 100]	Presidente Dutra
9	24	18	75,00	[52,23 – 97,77]	Lagoa Grande do Maranhão
10	35	22	62,86	[41,82 – 83,89]	Caxias
11	35	25	71,43	[51,76 – 91,1]	Caxias
12	20	1	5,00	[0,00 – 17,55]	Grajaú
13	13	7	53,85	[18,23 – 89,46]	Timon
Total	364	239	65,66	[59,25 – 72,07]	

Tabela 3 – Prevalência verdadeira estimada de fêmeas bovinas de corte soropositivas para BVDV em lotes destinados ao abate.

Lote	N	BVDV Positivo	Prevalência verdadeira estimada (%)	IC 99% (%)	Município de origem
1	35	31	91,93	[77,47 – 100]	Parnarama
2	20	10	51,67	[21,61 – 81,73]	Tuntum
3	21	14	69,07	[41,41 – 96,73]	Vitorino Freire
4	35	17	50,18	[27,46 – 72,89]	Passagem Franca
5	35	32	94,92	[82,19 – 100]	Colinas
6	35	27	80	[60,92 – 99,09]	Bom Lugar
7	35	15	44,21	[21,72 – 66,71]	Cidelândia
8	21	20	98,89	[86,40 – 100]	Presidente Dutra
9	24	18	77,77	[54,00 – 100]	Lagoa Grande do Maranhão
10	35	22	65,09	[43,13 – 87,05]	Caxias
11	35	25	74,04	[53,51 – 94,57]	Caxias
12	20	1	4,7	[0,00 – 17,80]	Grajaú
13	13	7	55,68	[18,51 – 92,86]	Timon
Total	364	239	68,02	[61,32 – 74,71]	

A prevalência evidenciada para o BoHV-1 (85,96%) entre os lotes estudados foi alta. A maior prevalência foi encontrada entre os animais do lote 1, com origem em Parnarama, conforme as tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Prevalência aparente de fêmeas bovinas de corte soropositivas para BoHV-1 em lotes destinados ao abate.

Lote	N	BoHV-1 Positivo	Prevalência aparente (%)	IC 99% (%)	Município de origem
1	35	34	97,14	[89,89 – 100]	Parnarama
2	20	15	75,00	[50,06 – 99,94]	Tuntum
3	21	17	80,95	[58,88 – 100]	Vitorino Freire
4	35	32	91,43	[79,24 – 100]	Passagem Franca
5	35	33	94,29	[84,18 – 100]	Colinas
6	35	30	85,71	[70,48 - 100]	Bom Lugar
7	35	32	91,43	[79,24 – 100]	Cidelândia
8	21	17	80,95	[58,88 – 100]	Presidente Dutra
9	24	18	75,00	[52,23 – 97,77]	Lagoa Grande do Maranhão
10	35	29	82,86	[66,45 – 99,27]	Caxias
11	35	30	85,71	[70,48 - 100]	Caxias
12	20	18	90,00	[72,72 – 100]	Grajaú
13	13	8	61,54	[26,78 – 96,29]	Timon
Total	364	313	85,99	[81,3 – 90,68]	

Tabela 5 – Prevalência verdadeira estimada de fêmeas bovinas de corte soropositivas para BoHV-1 em lotes destinados ao abate.

Lote	N	BoHV-1 Positivo	Prevalência verdadeira estimada (%)	IC 99% (%)	Município de origem
1	35	34	97,14	[89,87 – 100]	Parnarama
2	20	15	74,95	[49,96 – 99,94]	Tuntum
3	21	17	80,91	[58,80 – 100]	Vitorino Freire
4	35	32	91,41	[79,20 – 100]	Passagem Franca
5	35	33	94,27	[84,15 – 100]	Colinas
6	35	30	85,69	[70,42 – 100]	Bom Lugar
7	35	32	91,41	[79,20 – 100]	Cidelândia
8	21	17	80,91	[58,80 – 100]	Presidente Dutra
9	24	18	74,95	[52,14 – 97,76]	Lagoa Grande do Maranhão
10	35	29	82,82	[66,38 – 99,26]	Caxias
11	35	30	85,69	[70,42 – 100]	Caxias
12	20	18	89,98	[72,67 – 100]	Grajaú
13	13	8	61,46	[26,64 – 96,29]	Timon
Total	364	313	85,96	[81,27 – 90,66]	

Estudos anteriores realizados no MA apresentaram resultados análogos quanto à prevalência de BVDV, mas discrepantes quanto à prevalência de BoHV-1. Abas (2014), encontrou 54,04% (214/396) de indivíduos reagentes ao BVDV entre bovinos leiteiros na regional de Codó. Sousa et al. (2013), em pesquisa realizada com fêmeas leiteiras na ilha de São Luís, detectaram que 67,3% (105/156) delas eram reagentes ao BVDV. O estudo conduzido por Chaves et al. (2012) revelou uma frequência de 67,5% (108/160), 53,57% (150/280), 80% (96/120), 63,75% (102/160) e 74% (148/200), para as regiões da Ilha de São Luís, Imperatriz, Açailândia, Pedreiras e Bacabal, respectivamente.

Quanto ao BoHV-1, Freitas et al. (2014) encontraram frequência 63,23% (698/1104) para anticorpos anti-BoHV-1 em fêmeas bovinas de corte da Microrregião de Imperatriz. Sousa et al. (2013), em pesquisa realizada com fêmeas leiteiras na ilha de São Luís, detectaram que 67,5% (108/160) eram reagentes ao BoHV-1. Das amostras de fêmeas bovinas leiteiras analisadas por Bezerra et al. (2012), 69,25% (277/400) foram positivas para o BoHV-1.

No Pará, Viana et al. (2016) encontraram 36,0% (63/175) das amostras de búfalas reagente ao BVDV e 85,0% (178/210) reagente ao BoHV-1. Já Pasqualotto et al. (2015) encontraram em Santa Catarina prevalência menores: 28,5% (240/842) das amostras positivas para o BVDV e 57,54% (482/842) para o BoHV-1 em bovinos leiteiros. Thompson et al. (2006), na Paraíba, estimaram a prevalência para BVDV e BoHV-1 em 22,2% (520/2343) e 46,6% (1093/2343), respectivamente.

Alguns aspectos podem explicar a alta prevalência encontrada para o BoHV-1 (85,96%) no presente estudo. A princípio, pelo fato dos rebanhos de corte se caracterizarem por possuírem maior número de cabeças por propriedade, determinado por Fino et al. (2012) como fator de risco associado ao BoHV-1. Adicionalmente, pelo sistema de criação ser, no MA, majoritariamente extensivo, além da escassa utilização de inseminação artificial nos rebanhos do estado (BORBA, 2012), o que impossibilita um perfeito manejo da reprodução além de permitir ampla oportunidade de disseminação do agente no rebanho, visto que um único touro infectado pode disseminar o vírus ao longo de toda a vida através do sêmen contaminado. Deve-se levar em consideração ainda que 77,29% das propriedades rurais localizadas no MA não dão qualquer destino à placenta ou fetos abortados (BORBA, 2012), possibilitando aos animais contato direto com material potencialmente infectante.

Além disso, diversos estudos anteriores corroboram que a prevalência de bovinos positivos para BoHV-1 frequentemente é superior à de positivos para BVDV em um mesmo

rebanho, mesmo quando as prevalências encontradas são mais baixas, como nas pesquisas de Thompson et al. (2006), Pasqualotto et al. (2015) e Viana et al. (2016). Igualmente, percebe-se no presente estudo uma menor variabilidade de prevalências para o BoHV-1 entre os lotes, como pode ser evidenciado pelos os valores de desvio padrão (s) calculados (tabela 6), concordando com o que foi demonstrado por Thompson et al. (2006) e observado por Viana et al. (2016).

A prevalência encontrada para o BVDV (68,02%) pode ser explicada pela utilização de monta natural, ainda comum em rebanhos de corte no estado (BORBA, 2012), considerada fator de risco para o BVDV (CHAVES et al., 2012). Por outro lado, a maior variabilidade de prevalências entre os lotes pesquisados pode estar relacionada à presença de animais PI nos rebanhos, conforme demonstraram Thompson et al. (2006), evidenciando que a prevalência para BVDV é fortemente associada às propriedades. Entretanto, seria necessária uma nova pesquisa para confirmar tal hipótese, tendo em vista que o ELISA indireto não é capaz de detectar animais PI.

Na tabela 6 também é possível evidenciar que apenas os lotes 4, 7, 8, 10 e 12 apresentaram animais reagentes para os 3 patógenos estudados.

Tabela 6 – Prevalência aparente de fêmeas bovinas de corte soropositivas para brucelose bovina, BVDV e BoHV-1 em lotes destinados ao abate.

Lote	Prevalência aparente (%)			Município de origem
	BRU	BVDV	BoHV-1	
1	0,00	88,57	97,14	Parnarama
2	0,00	50,00	75,00	Tuntum
3	0,00	66,67	80,95	Vitorino Freire
4	0,83	48,57	91,43	Passagem Franca
5	0,00	91,43	94,29	Colinas
6	0,00	77,14	85,71	Bom Lugar
7	2,50	42,86	91,43	Cidelândia
8	19,05	95,24	80,95	Presidente Dutra
9	0,00	75,00	75,00	Lagoa Grande do Maranhão
10	1,47	62,86	82,86	Caxias
11	0,00	71,43	85,71	Caxias
12	5,00	5,00	90,00	Grajaú
13	0,00	53,85	61,54	Timon
14	0,00	-	-	Santa Luzia
Total	1,23	65,66	85,99	
s	6,17	0,244	0,096	

A tabela 7 apresenta a comparação entre a prevalência aparente encontrada entre as propriedades amostradas, evidenciando uma evolução no controle da brucelose no rebanho de corte no MA, mas que se faz necessário implementar em nível estadual estratégias de controle contra os vírus da BVD e da IBR.

Tabela 7 Prevalência aparente de propriedades positivas para Brucelose (BRU), BVDV e BoHV-1 entre os lotes pesquisados.

BRU Positivo		Prevalência aparente (%)				BoHV-1 Positivo	
n	%	BVDV Positivo				n	%
		n	%				
5/14	35,71	13/13	100	13/13		100	

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1. A prevalência de infecção pelo BoHV-1 (aparente: 85,99%; verdadeira: 85,96%) na amostra estudada é alta; a prevalência de infecção pelo BVDV (aparente: 65,66%; verdadeira: 68,02%) pode ser considerada média; e a prevalência aparente de infecção pela *Brucella abortus* (1,23%) é baixa;
2. A prevalência aparente de propriedades positivas (focos) para Brucelose Bovina (35,71%), BVDV (100%) e BoHV-1 (100%) entre os lotes estudados é alta;
3. A variabilidade de prevalência entre os lotes encontrada para Brucelose ($s=6,17$) é alta. A variabilidade de prevalência entre os lotes encontrada para o BVDV ($s=0,244$) é maior que a encontrada para o BoHV-1 ($s=0,096$).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A baixa prevalência encontrada para Brucelose Bovina na amostra estudada é um indício de que as ações do PNCEBT implementadas após a finalização do inquérito soroepidemiológico pela AGED, sob supervisão do MAPA, podem estar obtendo os resultados esperados pelo programa, particularmente nos rebanhos de corte do estado.

A alta prevalência para BoHV-1 e a menor variabilidade entre os lotes encontradas, em conjunto com resultados de pesquisas anteriores, evidenciam que o BoHV-1 está amplamente disseminado no MA independentemente do tipo de exploração e categoria de animais.

A alta variabilidade de prevalência entre os lotes encontrada para Brucelose Bovina e a prevalência encontrada para BVDV e BoHV-1 em fêmeas destinada ao abate indica que rebanhos de corte no MA terão dificuldades a curto prazo para selecionar animais aptos à exportação, tendo em vista que o maior importador de bovinos do Brasil na atualidade exige que os animais exportados com a finalidade de abate imediato sejam testados com resultado negativo para Brucelose Bovina e, caso a finalidade da exportação seja engorda, que os animais sejam testados também para BVD, à procura de animais PI, bem como para IBR.

A baixa variabilidade de prevalências encontradas para o BVDV corrobora resultados de pesquisas anteriores que afirmam que o controle sanitário específico da propriedade é mais importante para a prevenção da BVDV que uma política regional de controle.

A alta prevalência encontrada para o BoHV-1 sugere que o descarte de animais positivos com o objetivo de controlar a IBR em rebanhos de corte no MA pode ser economicamente inviável. É necessário que sejam realizadas pesquisas no intuito de identificar a prevalência de animais PI no estado, apresentando dados referentes a cada propriedade/lote estudado, para que se avalie a viabilidade de um programa de controle da BVD em rebanhos de corte no MA.

A modelagem hierárquica conduzida por Thompson et al. (2006) evidenciou que a prevalência para BoHV-1 e BVDV é minimamente influenciada pelos limites entre os municípios. Assim, para uma análise mais precisa da disseminação de ambos agentes, sugere-se que os resultados dos estudos subsequentes informem os dados de prevalência referentes a cada propriedade/lote estudado e não somente às regiões/municípios, como em grande parte das pesquisas até o momento.

REFERÊNCIAS

- ABAS, A. R. V. **Detecção de anticorpos e fatores de risco associados ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros no centro-leste maranhense – Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2014.
- ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Perfil da Pecuária no Brasil: Relatório Anual 2016**. Disponível em <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2017.
- ALFIERI, A. A., & ALFIERI, A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 133–139, 2017.
- ALFIERI, A. A.; FLORES, E. F.; PITUCO, E. M.; ROEHE, P. M.; VOGEL, F. S. F.; WEIBLEN, R. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.
- ALFIERI, A. A.; CASTRO, A. M. G.; CORTEZ, A.; GENOVEZ, M. E.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M. Detecção de ácidos nucleicos de *Brucella spp.*, *Leptospira spp.*, herpesvirus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 6, p. 1226-1228, 2006.
- ALICE WEB – SISTEMA DE ANÁLISE DAS INFORMAÇÕES DE COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 30 jun. de 2017.
- ALMEIDA, E. C. S. **Situação epidemiológica da brucelose no Estado de Pernambuco**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ALVES, A. J. S., GONÇALVES, V. S. P., FIGUEIREDO, V. C. F., LÔBO, J. R., BAHIENSE, L., AMAKU, M., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J.S., DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, supl. 1, p. 6–13, 2009.
- APARICIO, E. D. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 1, p. 43–51, 53–60, 2013.
- ARDANS, A. *Herpesviridae*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; COUTINHO, A. S. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 327-339.
- AZEVEDO, S.S., FERREIRA NETO, J.S., DIAS, R.A., FERREIRA, F., AMAKU, M., FIGUEIREDO, V.C.F., LÔBO, J.R., GONÇALVES, V.S.P., SOUZA, A.C., VASCONCELLOS, S.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 19-26, 2009.

BANCO CENTRAL DO BRASIL. **Boletim do Banco Central do Brasil - Relatório 2013: A economia brasileira.** Disponível em <<http://www.bcb.gov.br/pec/boletim/banual2013/rel2013cap1p.pdf>>. Acesso em: 30 jun. de 2017.

BAUERMANN, F. V, RIDPATH, J. F., WEIBLEN, R., & FLORES, E. F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**, v. 25, n. 1, p. 6–15, 2013.

BAUERMANN, F. V., RIDPATH, J. F., & DARGATZ, D. A. A serosurvey for ruminant pestivirus exposure conducted using cattle sera collected for brucellosis surveillance in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 1, p. 76–82, 2017.

BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SOUSA, V. E., SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Fatores de risco associados à infecção pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da região amazônica maranhense. **Arq Inst Biol**, v. 79, n. 1, p. 107-111, 2012.

BORBA, M. R. **Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado do Maranhão.** 2012. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

BORBA, M. R., STEVENSON, M. A., GONÇALVES, V. S. P., NETO, J. S. F., FERREIRA, F., AMAKU, M., DIAS, R. A. Prevalence and risk-mapping of bovine brucellosis in Maranhão State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 110, n. 2, p. 169–176, 2013.

BOREL, N., FREY, C. F., GOTTSTEIN, B., HILBE, M., POSPISCHIL, A., FRANZOSO, F. D., & WALDVOGEL, A. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 218–229, 2014.

BRASIL. **Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.** Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, nº 1.812 de 08-02-96 e nº 2.244 de 04-06-97.

BRASIL. **Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Instrução Normativa nº 6, de 8 de janeiro de 2004. Lex: **Manual de Legislação. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil.** Brasília, p. 125-142, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT e a Classificação das Unidades da Federação de acordo com o grau de risco para as doenças brucelose e tuberculose.** Instrução Normativa nº 19, de 10 de outubro de 2016.

BRODERSEN, B. W. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 453–64, 2014.

BROWN, L. D., CAT, T. T. & DASGUPTA, A. Interval Estimation for a proportion. **Statistical Science**, v. 16, p. 101-133, 2001.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Artmed, 2007.

CARVALHO, R. F. B. de; SANTOS, H. P.; MATHIAS, L. A.; PEREIRA, H. de M.; PAIXÃO, A. P.; FILHO, V. M. C.; ALVES, L. M. C. Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 0, p. 01–06, 2016.

CARVALHO, O. S., GONZAGA, L. N. R., ALBUQUERQUE, A. S., BEZERRA, D. C., CHAVES, N. P. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 9, p. 598-603, 2015.

CHATE, S.C., DIAS, R.A., AMAKU, M., FERREIRA, F., MORAES, G.M., COSTA NETO, A.A., MONTEIRO, L.A.R.C., LÔBO, J.R., FIGUEIREDO, V.C.F., GONÇALVES, V.S.P., & FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 46-55, 2009.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E., SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina em bovinos leiteiros não vacinados no estado do Maranhão. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 495-502, 2012.

CLEMENTINO, I. J. **Inquérito soropidemiológico da brucelose bovina no estado da Paraíba**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.

CLEMENTINO, I. J. & AZEVEDO, S. S. Bovine brucellosis: epidemiological situation in Brazil and disease control initiatives. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 2021–2034, 2016.

COSTA, E. P., QUEIROZ, V. L. D., JUNIOR, A. S., GUIMARÃES, J. D., ALVES, S. V. P., SANTOS, M. R., & SOUZA, L. F. L. BoHV-1 (o vírus da IBR) e sua relação com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 254–263, 2017

DECARO, N.; MARI, V.; LUCENTE, M. S.; SCJARRETTA, R.; ELIA, G.; RIDPATH, J. F.; BUONAVOGLIA, C. Detection of a Hobi-like virus in archival samples suggests circulation of this emerging pestivirus species in Europe prior to 2007. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3–4, p. 307–313, 2013.

DE FIGUEIREDO, P., FICHT, T. A., RICE-FICHT, A., ROSSETTI, C. A., & ADAMS, L. G. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1505–1517, 2015.

DE VRIES, S. G.; VISSER, B. J.; NAGEL, I. M.; GORIS, M. G.; HARTSKEERL, R. A.; GROBUSCH, M. P. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 47-64, 2014.

DEL FAVA, C. **Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte, infectados e não infectados pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1)**. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DEL FAVA, C. Reproductive rates and performance traits in beef cattle infected by Bovine Herpesvirus. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 43, n. 6, p. 739–746, 2006.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E.; GENOVEZ, M. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: Experiência do Instituto Biológico. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. 2, p. 73–79, 2007.

DIAS, J.A., MÜLLER, E.E., DIAS, R.A., FREITAS, J.C., AMAKU, M., FERREIRA, F., SILVA, M.C.P., LÔBO, J.R., FIGUEIREDO, V.C.F., GONÇALVES, V.S.P., & FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 66-76, 2009a.

DIAS, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; LIMA, Z. M. B.; PAULIN, L. M. S.; GUNNEWIEK, M. F. K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 118-125, 2009b.

DUCROTOY, M. J., CONDE-ÁLVAREZ, R., BLASCO, J. M., & MORIYÓN, I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 81-102, 2016.

FINO, T. C. M.; MELO, C. B.; RAMOS, A. F.; LEITE, R. C. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 36, n. 2, p. 122-127, 2012.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq. Vet. Bras**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FRANCO, A. C. & ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 435-488.

FREITAS, E. J. P.; LOPES, C. E. R.; MOURA FILHO, J. M.; SÁ, J. S.; SANTOS, H. P., & PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 1301–1310, 2014.

GARRITY, G. M., LILBURN, T. G., COLE, J. R., HARRISON, S. H., EUZÉBY, J., & TINDALL, B. J. The Bacteria: Phylum “Proteobacteria”, Class Alphaproteobacteria. **Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea**, v. 7, n. 3, p. 52–111, 2007.

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

GONÇALVES, V.S.P., RIBEIRO, L.A., CALDAS, R.A., FRANCISCO, P.F.C., DIAS, R.A., FERREIRA, F., AMAKU, M., FERREIRA NETO, J.S., FIGUEIREDO, V.C.F., LÔBO, J.R., & BORGES, J.R.J. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 14-18, 2009a.

GONÇALVES, V.S.P., DELPHINO, M.K.V.C., DIAS, R.A., FERREIRA, F., AMAKU, M., FERREIRA NETO, J.S., PORTO, T.B., ALVES, C.M., FIGUEIREDO, V.C.F., & LÔBO, J.R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 35-45, 2009b.

GREINER, M. & GARDNER, I. A. Application of diagnostic tests in epidemiologic studies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p. 43-59, 2000.

JOYA, M. A. P.; GONGORA, A.; JIMENEZ, C. Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. **Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias**, v. 24, n. 4, p. 634–646, 2011.

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

ICTV – INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy 2015**. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20160870>. Acesso em: 30 jun. de 2017.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal – 2015**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ma&tema=pecuaria2015>>. Acesso 29 de jun. de 2017.

IMESC – INSTITUTO MARANHENSE DE ESTUDOS SOCIOECONÔMICOS E CARTOGRÁFICOS. Produto Interno Bruto do Estado do Maranhão: Período 2010 a 2014. **Produt. Inter. Brut. do Maranhão**, São Luís, v. 11, p. 1-42, 2016.

KLEIN-GUNNEWIEK, M. F. C.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GITTI, C. B.; PEREIRA, L. A.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 77-84, 2009.

KELLING, C. L., & TOPLIFF, C. L. Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 20–25, 2013.

LANYON, S. R., HILL, F. I., REICHEL, M. P., & BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 201–9, 2014.

MARANHÃO, AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Anuário 2015: ações de defesa sanitária agropecuária no Maranhão** / Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Pesca. Agência Estadual de Defesa Agropecuária. Diretoria de Defesa Animal. _____ São Luís, 2016.

MARVULO, M. F. V.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; GROFF, A. C. M.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 93-102, 2009.

MOTA, A. DE A., A. L. A., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J. S., DIAS, R. A., AMAKU, M., HILDEBRAND GRISI-FILHO, J. H., TELLE, E. O. GONÇALVES, V. S. P. Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 226–232, 2016.

NEGREIROS, R.L., DIAS, R.A., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J.S., GONÇALVES, V.S.P., SILVA, M.C.P., FIGUEIREDO, V.C.F., LÔBO, J.R., FREITAS, J., & AMAKU, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 56-65, 2009.

NEWCOMER, B. W., & GIVENS, D. Diagnosis and Control of Viral Diseases of Reproductive Importance: Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 425–441, 2016.

OGATA, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; RODRIGUES, A. L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 126- 134, 2009.

OIE – World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017**. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em 30 de jun. 2017.

PASQUALOTTO, W., SEHNEM, S., & WINCK, C. A. Incidência de Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose em bovinos leiteiros da Região Oeste de Santa Catarina - Brasil. **Rev. Agro. Amb**, v. 8, n. 2, p. 249–270, 2015.

RAGAN, V., VROEGINDEWEY, G., & BABCOCK, S. International standards for brucellosis prevention and management. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), v. 32, n. 1, 189–198, 2013.

RICHTER, V., LEBL, K., BAUMGARTNER, W., OBRITZHAUSER, W., KÄSBOHRER, A., & PINIOR, B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Journal**, v. 220, p. 80-87, 2017.

RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105–121, 2010.

RIDPATH, J. F., FALKENBERG, S. M., BAUERMAN, F. V., VANDERLEY, B. L., DO, Y., EDUARDO, F., RODMAN, D. M., & NEILL, J. D. Comparison of acute infection of calves exposed to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhea virus or a HoBi-like virus. **Am J Vet Res**, v. 74, n. 3, p. 1–5, 2013.

RIDPATH, J.F. & FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 563-592.

ROCHA, W.V., GONÇALVES, V.S.P., COELHO, C.G.N.F.L., BRITO, W.M.E.D., DIAS, R.A., DELPHINO, M.K.V.C., FERREIRA, F., AMAKU, M., FERREIRA NETO, J.S., FIGUEIREDO, V.C.F., LÔBO, J.R., & BRITO, L.A.B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 27-34, 2009.

RODNING, S. P., GIVENS, M. D., MARLEY, M. S. D., ZHANG, Y., RIDDELL, K. P., GALIK, P. K., HATHCOCK, T. L., GARD, J. A., PREVATT, J. W., OWSLEY, W. F. Reproductive and economic impact following controlled introduction of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus into a naive group of heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1508–1516, 2012.

ROGAN, W. J., GLADEN, B. Estimating prevalence from the results of a screening test. **American Journal of Epidemiology**, v. 107, p. 71-76, 1978.

SANTOS, R. L., MARTINS, T. M., BORGES, A. M., PAIXÃO, T. A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 6, p. 759-764, 2013.

SCOT CONSULTORIA. **Vantagens da Exportação de Bovinos Vivos no Brasil: Atualização 2015**. Disponível em: <<http://www.abegbrasil.org/Scot/revista6/>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

SERGEANT, E. S. G., 2017. **Epitools epidemiological calculators**. Ausvet Pty Ltd. Disponível em: <<http://epitools.ausvet.com.au>>. Acesso em 01 de jun. 2017.

SIGSIF – SERVIÇO DE INFORMAÇÕES GERENCIAIS DO SIF. **Movimento de Abate** Disponível em: < http://sigsif.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet/SIGSIF.html >. Acesso em: 30 jun. 2017.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, p. 103- 108, 2009.

SILVA, V. G. S. O.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; COSTA, E. L. S.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 109-117, 2009.

SISREC - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE REQUISITOS E CERTIFICADOS DA ÁREA ANIMAL. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sisrec/manterDocumento!abrirFormConsultarDocumento.action>>. Acesso em 30 jun. de 2017.

SOUSA, V. E.; BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BOHV-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 35, n. 1, p. 21–25, 2013.

SOUZA, Márcio Rodrigues dos Santos. **Estimation of Sensitivity and Specificity of Diagnostic Tests of Bovine Brucellosis via Bayesian Inference**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

STOTT, J. *Togaviridae e Flaviviridae*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; COUTINHO, A. S. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 358-367.

THOMPSON, J. A., LEITE, R. M. H., GONÇALVES, V. S. P., LEITE, R. C., BANDEIRA, D. A., HERRMANN, G. P., MOREIRA, E. C., PRADO, P. E. F., LOBATO, Z. I. P., BRITO, C. P. T., LAGE, A. P. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 76, n. 3–4, p. 290–301, 2006.

VIANA, L.; BAPTISTA, F.; TELES, J.; RIBEIRO, A. P. C.; PIGATTO, C. P. SOROPOSITIVIDADE E LESÕES SUGESTIVAS DE BRUCELOSE EM BOVINOS ABATIDOS NO ESTADO DE TOCANTINS, BRASIL. **Arq. Inst. Biol**, v. 77, n. 3, p. 517–520, 2010.

VIANA, R. B., FAVA, C. DEL, MONTEIRO, B. M., MOURA, A. C. B., ALBUQUERQUE, R. S., CARDOSO, E. C., ARAÚJO, C. V., PITUCO, E. M. Ocorrência do vírus da leucose enzoótica dos bovinos (BLV) e de anticorpos contra herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em búfalos no Estado do Pará. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 01–07, 2016.

VILLAR, K. S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; BENITEZ, F.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 85-92, 2009.

WALKER, R. *Brucella*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; COUTINHO, A. S. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 185-191.

WAHIS – WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION SYSTEM. **List of countries by disease situation.** Disponível em <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist>. Acesso em: 30 jun. 2017.

WEBER, M. N.; SILVEIRA, S.; MACHADO, G.; GROFF, F. H. S.; MÓSENA, A. C. S.; BUDASZEWSKI, R. F.; CANAL, C. W. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus research**, v. 191, p. 117-124, 2014.