

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**ÍTALO CÂMARA DE ALMEIDA**

**FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A ENFERMIDADES VIRAIS EM VACAS  
LEITEIRAS NA REGIÃO DO CAPARAÓ, ESPÍRITO SANTO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2019**

**ÍTALO CÂMARA DE ALMEIDA**

**FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A ENFERMIDADES VIRAIS EM VACAS  
LEITEIRAS NA REGIÃO DO CAPARAÓ, ESPÍRITO SANTO**

**Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal na área de concentração de Produção, Reprodução e Saúde Animal**

**Orientadora: Professora Paula Alessandra Di Filippo**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

A447 Almeida, Ítalo Câmara de.

Fatores de risco associados a enfermidades virais em vacas leiteiras na região do Caparaó, Espírito Santo / Ítalo Câmara de Almeida. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

70 f.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.  
Orientadora: Paula Alessandra Di Filippo.

1. 17. 2. 32 - 37. 3. 50 - 53. 4. 66 - 70. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 636

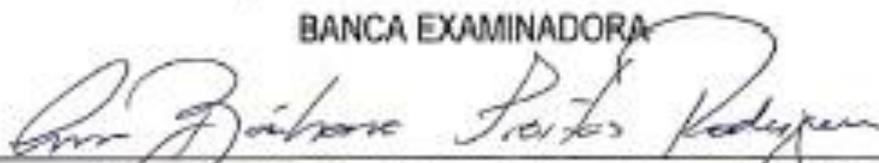
ÍTALO CÂMARA DE ALMEIDA

FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A ENFERMIDADES VIRAIS EM VACAS  
LEITEIRAS NA REGIÃO DO CAPARAÓ, ESPÍRITO SANTO

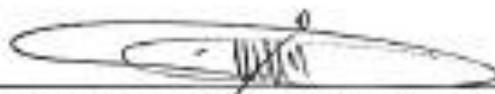
Tese apresentada ao Centro de  
Ciências e Tecnologias Agropecuárias  
da Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Doutor em Ciência Animal na área  
de concentração de Produção,  
Reprodução e Saúde Animal

Aprovada em 24 de junho de 2019

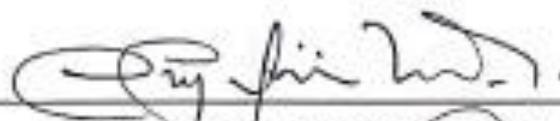
BANCA EXAMINADORA



Professora Dr<sup>a</sup>. Ana Bárbara Freitas Rodrigues - UENF



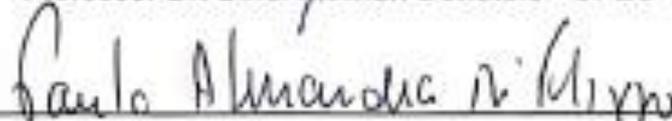
Professor Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho - UENF



Professor Dr. Olney Vieira da Motta - UENF



Professor Dr. Dirlei Molinari Donatele - UFES



Professora Dr<sup>a</sup>. Paula Alessandra Di Filippo - UENF

(Orientadora)



À minha família, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pois com Ele ao meu lado concluo mais uma etapa em minha vida;

Aos meus pais Inês e José Antônio pelo amor, dedicação e apoio constante em minhas decisões, sempre acreditando e confiando nos meus sonhos;

À minha irmã Talita pela amizade e companheirismo incondicional, ao Leandro pela parceria e aos meus sobrinhos Inácio e Levi, que iluminam nossas vidas;

À minha namorada pela força, incentivo e principalmente paciência;

À orientadora Paula Alessandra Di Filippo pela confiança e oportunidade;

Aos professores e amigos da UFES Dirlei Molinari Donatele e Graziela Barioni, e IFES Renata Cogo Clipes, pela ajuda, presença e participação;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo pelo apoio financeiro;

A Universidade Federal do Espírito Santo, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. E, todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

*"Trabalha como se tudo dependesse de ti  
e confia como se tudo dependesse de Deus."*

Inácio de Loyola (1491 - 1556).

## RESUMO

**ALMEIDA, Ítalo Câmara, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Junho de 2019. Fatores de risco associados a enfermidades virais em vacas leiteiras na região do Caparaó, Espírito Santo. Orientadora: Paula Alessandra Di Filippo.**

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a soroprevalência de enfermidades virais, a saber Leucose Enzoótica Bovina (LEB), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarreia Viral Bovina (BVD), em vacas de leite, nos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo (ES), a possível relação entre tais enfermidades e mastite, bem como os fatores de risco associados às enfermidades virais. Foram avaliadas 854 vacas mestiças provenientes de 69 propriedades rurais localizadas nos 12 municípios que compõem a região, entre os meses de fevereiro a julho de 2015. Amostras de sangue venoso foram coletadas e a soroprevalência de LEB foi determinada pelo teste de imunodifusão em gel de ágar, e IBR e BVD por ELISA indireto. A detecção da mastite clínica foi realizada por meio do teste da caneca de fundo preto e a mastite subclínica pelo California Mastite Teste. As variáveis avaliadas foram reutilização de agulhas descartáveis, tipo de ordenha, manejo reprodutivo, mortalidade de bezerros, presença de problemas reprodutivos, realização de teste de brucelose e nível de produção. Os resultados foram demonstrados por meio de análise descritiva e as associações entre as variáveis foram estimadas pelo Odds Ratio (OR) e intervalo de 95% de confiança. A significância das associações ( $p < 0,05$ ) foi realizada pelo teste Qui-quadrado. A prevalência média de LEB, IBR, BVD, mastite clínica e mastite subclínica para a região foi respectivamente de 56,79%, 48,59%, 26,46%, 5,50% e 43,55%. Houve associação positiva entre o vírus da LEB e a presença de mastite subclínica; IBR e mastite subclínica; BVD e mastite clínica ( $p < 0,05$ ). Os fatores de risco associados a LEB foram reutilização de agulhas descartáveis, ordenha mecânica, mortalidade de bezerros e problemas reprodutivos; para IBR foram monta natural e ordenha mecânica e para BVD problemas reprodutivos, ordenha mecânica e mortalidade de bezerros ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que as enfermidades virais pesquisadas encontram-se disseminadas nos rebanhos leiteiros dos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo, bem como mastite clínica e subclínica. Animais sororreagentes para as

enfermidades virais estudadas aumentam suas chances de serem positivas para mastite clínica e/ou subclínica. As informações encontradas no presente trabalho permitiram a identificação de pontos críticos no manejo, que é caracterizado pelos fatores de risco encontrados, tais deficiências podem acarretar em perdas produtivas pela ocorrência das enfermidades diagnosticadas. Se faz necessário discussões de qual o melhor sistema de manejo sanitário para a região, com melhor resposta econômica e social e posteriormente elaboração de medidas educativas e de implementação, por meio de assistência técnica especializada.

**Palavras-chave:** diarreia viral bovina, leucose, mastite, rinotraqueíte infecciosa bovina, vacas mestiças.

## ABSTRACT

**ALMEIDA, Ítalo Câmara, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. June, 2019. Risk factors associated with viral diseases in dairy cows in the region of Caparaó, Espírito Santo. Advisor: Paula Alessandra Di Filippo.**

The objective of this study was to evaluate the seroprevalence of viral diseases, namely Enzootic Bovine Leukosis (EBL), Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) and Bovine Viral Diarrhea (BVD) in dairy cows in the municipalities of Caparaó, Espírito Santo (ES), as well as the risk factors associated with viral diseases and the possible relationship between these diseases and mastitis. A total of 854 crossbred cows from 69 farms located in the 12 municipalities that make up the region between February and July 2015 were evaluated. Venous blood samples were collected and EBL seroprevalence was determined by the agar gel immunodiffusion test and IBR and BVD by indirect ELISA. The detection of clinical mastitis was performed using the black background mug test and subclinical mastitis using the California Mastitis Test. The variables evaluated were reuse of disposable needles, type of milking, reproductive management, calf mortality, presence of reproductive problems, brucellosis test and production level. The results were demonstrated through descriptive analysis and the associations among the variables were estimated by Odds Ratio (OR) and respective 95% of confidence intervals. The significance of the associations ( $p < 0.05$ ) was performed by the Chi-square test. The mean prevalence of EBL, IBR, BVD, clinical mastitis and subclinical mastitis for the region was 56.79%, 48.59%, 26.46%, 5.50% and 43.55%, respectively. There was a positive association between the EBL virus and the presence of subclinical mastitis; IBR and subclinical mastitis; BVD and clinical mastitis ( $p < 0.05$ ). The risk factors associated with EBL were reuse of disposable needles, mechanical milking, calf mortality and reproductive problems; for IBR were natural mating and mechanical milking and for BVD reproductive problems, mechanical milking and calf mortality ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the viral diseases are disseminated in the dairy herds of the municipalities of Caparaó, Espírito Santo, as well as clinical and subclinical mastitis. Seroreagent animals for the viral diseases studied increase their chances of being

positive for clinical and/or subclinical mastitis. The information found in the present study allowed the identification of some critical points in the management, which is characterized by the risk factors found, such deficiencies can lead to productive losses due to the occurrence of diagnosed diseases. It is necessary to discuss the best sanitary management system for the region, with a better economic and social response and then elaborate educational and implementation measures, through specialized technical assistance.

**Keywords:** bovine viral diarrhea, crossbred cows, infectious bovine rhinotracheitis, leucosis, mastitis.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3. REFERÊNCIAS .....	17
4. DESENVOLVIMENTO.....	18
4.1. CAPÍTULO 1 - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO RELACIONADOS À LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A MASTITE .....	18
4.1.1. RESUMO .....	18
4.1.2. ABSTRACT .....	19
4.1.3. INTRODUÇÃO .....	20
4.1.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
4.1.6. CONCLUSÃO .....	31
4.1.7. AGRADECIMENTOS.....	32
4.1.8. REFERÊNCIAS .....	32
4.2. CAPÍTULO 2 - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA .....	38
4.2.1. RESUMO .....	38
4.2.2. ABSTRACT .....	39
4.2.3. INTRODUÇÃO .....	40
4.2.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	41
4.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
4.2.6. CONCLUSÃO .....	49
4.2.7. AGRADECIMENTOS.....	49
4.2.8. REFERÊNCIAS .....	50
4.3. CAPÍTULO 3 - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À DIARREIA VIRAL BOVINA.....	54
4.3.1. RESUMO .....	54
4.3.2. ABSTRACT .....	55
4.3.3. INTRODUÇÃO .....	56
4.3.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	58
4.3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60

4.3.6. CONCLUSÃO .....	65
4.3.7. AGRADECIMENTOS.....	66
4.3.8. REFERÊNCIAS.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) o agronegócio brasileiro contribuiu com 23,5% do Produto Interno Bruto no ano de 2017, ainda segundo a CNA, foi a maior participação nos últimos 13 anos, sendo que a cadeia leiteira teve desempenho positivo de 9,83%, com uma renda estimada no seguimento de R\$ 63,6 bilhões no ano (CEPEA, 2017).

O Espírito Santo possui mais de 30 mil estabelecimentos agropecuários que têm como atividade a bovinocultura e, de acordo com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER, 2012), o Estado possui um rebanho de aproximadamente 2,3 milhões de cabeças de gado, e estima-se que deste total, 419 mil cabeças são destinadas à pecuária leiteira, produzindo aproximadamente 1,3 milhão de litros de leite ao ano (IBGE, 2017).

A região do Caparaó Capixaba é composta por 12 municípios (Alegre, Bom Jesus do Norte, Divino de São Lourenço, Dolores do Rio Preto, Guaçuí, Ibatiba, Ibitirama, Irupi, Lúna, Jerônimo Monteiro, Muniz Freire e São José do Calçado), e constitui importante bacia produtora de leite no Estado. Em 2015 a região do Caparaó produziu cerca de 69 mil litros de leite, que foram entregues para laticínios com inspeção estadual ou federal, o que representa aproximadamente 14% da produção total do Espírito Santo (IBGE, 2017).

Apesar da crescente expansão da bovinocultura nos últimos anos e da sua importância na economia nacional, ainda são poucos os programas oficiais de saúde animal. Neste contexto, perdas produtivas e reprodutivas estão relacionadas às doenças virais infectocontagiosas, dentre elas a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), a Diarreia Viral Bovina (BVD) e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), pois essas uma vez instaladas no rebanho se espalham geralmente de forma silenciosa, causando debilidade do sistema imunológico, podendo ainda atuar como fatores predisponentes à mastite.

Considerando a importância dessas enfermidades na cadeia produtiva de carne e leite, a segurança do produto final para o consumidor, a imagem do País junto ao mercado mundial, e a conjuntura econômica frente à exportação de produtos oriundos da bovinocultura, se faz necessário à realização de estudos que

visam esclarecer a situação epidemiológica dessas enfermidades no rebanho bovino brasileiro, sobretudo no estado do Espírito Santo, indicando as melhores estratégias para que se possa traçar o perfil dessas enfermidades na região do Caparaó e criar mecanismos efetivos para a solução dos problemas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Objetivou-se com o presente trabalho realizar o levantamento epidemiológico da mastite, a soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina, Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em vacas leiteiras nos 12 municípios da região do Caparaó, Espírito Santo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a possível relação das enfermidades virais (LEB, IBR e BVD) com a mastite;
- Traçar fatores de risco associados às enfermidades virais.

### 3. REFERÊNCIAS

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP. PIB do Agronegócio - Brasil, Julho/2017. Disponível em: <[https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Relatorio%20PIBAGRO%20Brasil\\_JULHO\\_CNA.pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Relatorio%20PIBAGRO%20Brasil_JULHO_CNA.pdf)>. Acesso em: 20 de Setembro de 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em: 21 de Abril de 2018.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural ; **Incaper em Revista**, 2012. Disponível em: <<http://incaper.web407.uni5.net/revista.php?idcap=979>>. Acesso em: 03 de Outubro de 2017.

## 4. DESENVOLVIMENTO

### 4.1. CAPÍTULO 1 - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO RELACIONADOS À LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A MASTITE

Seroprevalence and risk factors related to enzotic bovine leucosis and its association with mastitis

#### 4.1.1. RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) nos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo (ES), a possível relação entre LEB e mastite, bem como os fatores de risco associados à LEB. Foram avaliadas 854 vacas mestiças de aptidão leiteira provenientes de 69 propriedades rurais localizadas nos 12 municípios que compõem a região, entre os meses de fevereiro a julho de 2015. Amostras de sangue venoso foram coletadas e a soroprevalência da LEB foi determinada pelo teste de imunodifusão em gel de ágar. A detecção da mastite clínica foi realizada por meio do teste da caneca de fundo preto e a mastite subclínica pelo California Mastite Teste. Os fatores de risco avaliados foram reutilização de agulhas descartáveis, tipo de ordenha, manejo reprodutivo, mortalidade de bezerros, presença de problemas reprodutivos e nível de produção (pequena = 53 litros/leite/dia; média = 54 a 133 litros/leite/dia; e grande = acima 133 litros de leite por dia). Os resultados foram demonstrados por meio de análise descritiva e as associações entre as variáveis foram estimadas pelo Odds Ratio (OR) e intervalo de 95% de confiança. A significância das associações ( $p < 0,05$ ) foi realizada pelo teste Qui-quadrado. A prevalência média de LEB para a região foi de 56,79%, variando entre 19,29 a 87,71%. A prevalência média para mastite clínica e subclínica foi de 5,50 e 43,55%, respectivamente. Houve associação positiva entre o vírus da LEB e a presença de mastite subclínica ( $p < 0,05$ ; OR=1,41; IC=1,07-1,86). A reutilização de agulhas descartáveis (OR=1,92; IC=1,46-2,53), ordenha mecânica (OR=2,03; IC=1,34-3,08), mortalidade de bezerros (OR=2,39; IC=1,25-4,55) e a presença de problemas reprodutivos (OR=1,62; IC=1,23-2,14) foram considerados fatores de risco associados à LEB ( $p < 0,05$ ). A monta natural e nível de produção não apresentaram relação com a LEB. Conclui-se

que a LEB encontra-se disseminada nos rebanhos de leite dos municípios da região do Caparaó Capixaba. As prevalências de mastite clínica e subclínica estão elevadas em determinados municípios pesquisados. A presença de LEB aumenta as chances do desenvolvimento de mastite subclínica. A reutilização de agulhas descartáveis e ordenhadeira mecânica foram considerados fatores de risco associados à LEB. Animais sororreagentes para LEB apresentam maiores chances de manifestarem mortalidade de bezerros e problemas reprodutivos. Se faz necessário discussões de qual o melhor sistema de manejo sanitário para a região, com melhor resposta econômica e social e posteriormente realizar a elaboração de medidas educativas e de implementação, por meio de assistência técnica.

**Palavras-chave:** IDGA; Mastite clínica; Mastite subclínica; Vacas mestiças.

#### 4.1.2. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the seroprevalence of Enzootic Bovine Leukosis (EBL) in the municipalities of Caparaó, Espírito Santo (ES), the possible relationship between LEB and mastitis, as well as the risk factors associated with EBL. A total of 854 dairy cows were collected from 69 farms located in the 12 municipalities that make up the region between February and July 2015. Venous blood samples were collected and the EBL seroprevalence was determined by the immunodiffusion test in agar gel. The detection of clinical mastitis was performed using the black background mug test and subclinical mastitis by the California Mastitis Test. The risk factors evaluated were reuse of disposable needles, type of milking, reproductive management, calf mortality, presence of reproductive problems and production level (small = 53 liters / milk / day; mean = 54 to 133 liters / milk / day; and large = up to 133 liters of milk per day). The results were demonstrated through descriptive analysis and the associations among the variables were estimated by Odds Ratio (OR) and respective 95% of confidence intervals. The significance of the associations ( $p < 0.05$ ) was performed by the Chi-square test. The mean prevalence of EBL for the region was 56.79%, ranging from 19.29 to 87.71%. The mean prevalence for clinical and subclinical mastitis was 5.50 and 43.55%, respectively. There was a positive association between the EBL virus and the presence of subclinical mastitis ( $p < 0.05$ , OR = 1.41, CI = 1.07-1.86). The reuse of disposable needles (OR = 1.92, CI = 1.46-2.53), mechanical milking (OR = 2.03, CI = 1.34-3.08), calf mortality (OR = 2 , 39; CI = 1.25-4.55) and the presence of reproductive problems (OR = 1.62; CI = 1.23-2.14) were considered risk factors associated with LEB ( $p < 0.05$  ). Natural mating and production level were not related to EBL. It is concluded that EBL is widespread in dairy herds of the municipalities of Caparaó

Espírito Santo's region. The prevalence of clinical and subclinical mastitis is high in some cities surveyed. The presence of EBL increases the chances of developing subclinical mastitis. The reuse of disposable needles and mechanical milking were considered risk factors associated with EBL. Seroreagent animals for EBL are more likely to present calf mortality and reproductive problems. It is necessary to discuss the best sanitary management system for the region, with a better economic and social response and then carry out the elaboration of educational and implementation measures, through technical assistance.

**Keywords:** AGID; Clinical mastitis; Subclinical mastitis; Crossbred cows

#### 4.1.3. INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade viral de aspecto crônico e possui como agente etiológico um retrovírus denominado Vírus da Leucemia Bovina (VLB). Possui ampla distribuição em rebanhos bovinos leiteiros, podendo levar vários anos até que ocorram as primeiras manifestações clínicas (FLORINS et al., 2008).

No Brasil, a LEB foi descrita nos estados de Minas Gerais (CAMARGOS et al., 2002), São Paulo (MEGID et al., 2003), Rio de Janeiro (ROMERO, ROWE, 1981), Tocantins (FERNANDES, 2007), Bahia (MATOS, BIRGEL-JÚNIOR, BIRGEL, 2005), Rio Grande do Sul (POLETTTO et al., 2004) dentre outros, com prevalência variando de 23,5 a 54,3%. No estado do Espírito Santo a soroprevalência de 27,9% em vacas de leite no município de Alegre (STARLING et al., 2013) e 21,86% em bovinos abatidos no município de Anchieta (ASSIS et al., 2015) foram relatadas.

As perdas econômicas decorrente da leucose referem-se principalmente à redução da produção leiteira e morte dos animais. Relatos de redução de 3% na produção leiteira resultando em US\$ 59 de prejuízo anual por vaca foram descritos em rebanho infectado pelo VLB nos Estados Unidos (ERSKINE et al., 2011). No referido estudo, as perdas econômicas apresentaram correlação positiva com a prevalência da infecção.

O vírus infecta principalmente as células B, no entanto há evidências de que ocorram alterações em linfócitos T e monócitos, modificações na produção de

citocinas, na expressão de receptores de superfície, na capacidade de proliferação, e apoptose de algumas células também foram relatadas (RAVAZZOLLO, COSTA, 2007; FRIE, COUSSENS, 2015). Animais soropositivos para o VLB são mais susceptíveis a desenvolver doenças de origem infecciosas como mastite, pododermatite, bronquite, pneumonia (EMANUELSON, SCHERLING, PETTERSSON, 1992), tuberculose bovina (RAMOS et al., 2016) e rinotraqueíte infecciosa bovina (ALEXANDRINO et al., 2011).

Vacas positivas para leucose são mais predispostas ao desenvolvimento de mastite clínica no pós-parto (KAKINUMA et al., 2014; GARCIA et al., 1995). Correlação entre LEB e presença de mastite, tanto na forma clínica quanto subclínica, indica que quanto maior o número de animais positivos para leucose maior o número de animais com mastite. Há relatos que animais positivos para leucose apresentam produção menor de leite quando comparado com animais negativos (RAJÃO et al., 2014).

Frente ao exposto, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo, a possível associação entre leucose e mastite e os fatores de risco relacionados à leucose.

#### 4.1.4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso em Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o número de protocolo 003/2015.

Foram utilizadas 854 vacas mestiças (*Bos tauros tauros x Bos taurus indicus*) de aptidão leiteira, clinicamente saudáveis, em diferentes fases de lactação provenientes de propriedades localizadas nos 12 municípios que compõem a Microrregião do Caparaó Capixaba (20° 26' 5" S e 41° 47' 2" O), no Sul do Espírito Santo (Alegre, Bom Jesus do Norte, Divino de São Lourenço, Dolores do Rio Preto, Guaçuí, Ibatiba, Ibitirama, Irupi, Lúna, Jerônimo Monteiro, Muniz Freire e São José do Calçado), no período de fevereiro a julho de 2015. No total foram avaliadas 69

propriedades ao acaso, sendo cinco propriedades avaliadas por município, com exceção de Alegre com nove e Jerônimo Monteiro, onde dez propriedades foram avaliadas.

Amostras de sangue total foram coletadas de todas as vacas em lactação, por meio de punção da veia coccígea média em sistema de coleta a vácuo. O sangue colhido foi acondicionado em tubos sem anticoagulante e transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório de Produção Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo. Após colheita, as amostras foram centrifugadas a 200 G durante 5 minutos para a obtenção do soro, o qual foi fracionado em tubos de polietileno de 1,5 mL e armazenados a menos 80 °C. O exame de Leucose Enzoótica Bovina foi realizado por imunodifusão em gel de ágar (IDGA), em Ágar Noble Difco® (Sparks, Nevada, EUA), com antígenos TECPAR® (Curitiba, Paraná, Brasil), segundo as recomendações do fabricante.

A detecção de mastite clínica foi determinada por meio da identificação dos sinais clínicos de inflamação da glândula mamária e pelo teste da caneca de fundo preto. A mastite subclínica foi diagnosticada por meio do California Mastite Teste (CMT). O animal foi considerado positivo para mastite clínica ou subclínica quando houve alteração ao teste da caneca ou CMT respectivamente, em pelo menos um teto.

As variáveis analisadas foram prevalência de LEB, mastite clínica e mastite subclínica, a possível relação entre LEB e mastite, bem como o questionário referente a reutilização de agulhas descartáveis (sim/não), tipo de ordenha (manual/mecânica), manejo reprodutivo (inseminação artificial/monta natural), mortalidade de bezerros alta (sim/não) e se a propriedade apresentava problemas reprodutivos (sim/não). As propriedades foram classificadas em pequenas, médias e grandes produtoras de leite com respectivas produções de até 53 litros, de 54 a 133 e acima de 133 litros de leite por dia (BARROS et al., 2001).

O cálculo do número amostral foi realizado de acordo com a fórmula abaixo:

$$n = def \times \frac{Npq}{\frac{d^2}{1.96^2} (n - 1) + pq}$$

Onde:

$n$  = tamanho da amostra;

$deff$  = efeito do design;

$N$  = tamanho da população;

$p$  = proporção estimada;

$q = 1 - p$ ;

$d$  = nível de precisão absoluto.

Utilizando frequência antecipada de 50% para as enfermidades (leucose e mastite), limite de confiança de 5%, intervalo de confiança de 99% e efetivo bovino do estado do Espírito Santo de 2.223.531 cabeças de gado no ano do estudo (IBGE, 2019), o número mínimo para o tamanho amostral calculado foi de 664 animais. Portanto, o tamanho amostral do presente estudo de 854 animais proporciona representatividade estatística.

Os resultados estatísticos foram demonstrados por meio de análise descritiva e as associações entre as variáveis foram estimadas pela razão dos produtos cruzados - Odds Ratio (OR) e intervalo de 95% de confiança. O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar a significância das associações ( $p < 0,05$ ). Os cálculos foram realizados no programa OpenEpi 3.01 (DEAN, SULLIVAN, SOE, 2013).

#### 4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência para Leucose Enzoótica Bovina nos municípios que compõem a região do Caparaó, estado do Espírito Santo (ES) encontra-se descrita na Tabela 1. Como pode ser observado, na região estudada foi encontrada prevalência média de 56,79% (485/854).

Tabela 1: Soroprevalência de Leucose Enzoótica Bovina (LEB) pelo teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

<b>Município</b>	<b>Animais reagentes</b>	<b>Animais não reagentes</b>	<b>Total</b>	<b>Prevalência de LEB (%)</b>
Ibatiba	11	46	57	19,29
Bom Jesus do Norte	9	29	38	23,68
Dores do Rio Preto	41	43	84	48,80
Divino de São Lourenço	32	31	63	50,79
São José do Calçado	24	21	45	53,33
Guaçuí	20	16	36	55,55
Jerônimo Monteiro	77	60	137	56,20
Lúna	43	26	69	62,31
Alegre	95	48	143	66,43
Muniz Freire	51	24	75	68,00
Ibitirama	52	20	72	72,22
Irupi	30	5	35	87,71
<b>Total</b>	<b>485</b>	<b>369</b>	<b>854</b>	<b>56,79</b>

Houve grande oscilação na soroprevalência de LEB (19,29 a 87,71%) nos municípios estudados (Tabela 1). Corroborando ao presente trabalho, variação foi encontrada em outros estados do Brasil; Alagoas com 27,8% (PINHEIRO JÚNIOR et al., 2013), 56,34% no Paraná (BARROS FILHO et al., 2010), em Minas Gerais 79,7% (RAJÃO, 2008), Tocantins com 37% (FERNANDES, 2007), 41% na Bahia (MATOS, BIRGEL-JÚNIOR, BIRGEL, 2005), Rio Grande do Sul com 23,5% (POLETTTO et al., 2004) e 52% em São Paulo (MEGID et al., 2003). A LEB é uma doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e foi diagnosticada em vários países como Canadá, Estados Unidos, Alemanha, Portugal, Argentina e Chile (OIE, 2009).

Quando compara-se os resultados do presente trabalho com estudos previamente descritos no estado do Espírito Santo, soroprevalência de 21,86% (204/933) em bovinos abatidos em frigorífico no município de Anchieta e de 27,9% (114/409) em vacas de leite no município de Alegre foram encontradas (ASSIS et al., 2015; STARLING et al., 2013). Percebe-se que houve aumento substancial em relação à soroprevalência de LEB no município de Alegre, no presente trabalho foram observados 66,43%.

O desconhecimento por parte dos produtores em relação à doença e a falta de adoção de medidas que contribuam para seu controle e eliminação favorecem o aparecimento de novos casos no rebanho (DEL FAVA, PITUCO, 2004). Portanto, o aumento nos números de animais sororreagentes evidencia a importância do

esclarecimento aos produtores em relação à enfermidade e da adoção de medidas sanitárias com o intuito de diminuir a disseminação do vírus da Leucose Enzoótica Bovina nos rebanhos do Espírito Santo.

Bovinos de corte apresentam menor prevalência de LEB quando comparado a bovinos leiteiros, isso se deve ao fato que animais voltados para a produção leiteira serem criados de modo mais intensivo do que animais de corte, facilitando a disseminação da doença. Outro fator que poderia explicar a maior prevalência em vacas de leite é que estas possuem vida produtiva maior, visto que animais de corte são abatidos mais precocemente (MENDES et al., 2011; DEL FAVA, PITUCO, 2004). Contudo, vários outros fatores podem contribuir para os altos índices de animais sororreagentes para leucose nos rebanhos da região do Caparaó Capixaba, como a idade, ausência de exames na compra, utilização de mesma luva de palpação retal em diferentes animais e utilização de mesma agulha para aplicação de medicamentos e vacinação (RAJÃO et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2011).

Em relação à mastite, 100% das propriedades avaliadas (n=69) tiveram pelo menos um caso encontrado, na forma clínica ou subclínica, destaque para o município de Bom Jesus do Norte, onde não foi verificada a presença de mastite clínica. Das 854 vacas avaliadas 5,50% (n=47) apresentaram mastite clínica e 43,55% (n=372) apresentaram mastite subclínica (Tabela 2). Os valores aceitáveis para mastite clínica no rebanho estão compreendidos entre 2 a 5% (PHILPOT, NICKERSON, 2002). Prevalência de 4,6% para mastite clínica em vacas mestiças no Pará (OLIVEIRA et al., 2011) e 10,5% em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2013) foram descritas. Tais diferenças encontradas podem estar relacionadas com o sistema de criação, tipo de manejo, intensificação e nível de produção.

Tabela 2: Prevalência de mastite clínica e subclínica em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

Município	Mastite clínica			Mastite Subclínica		
	+	n	%	+	n	%
Divino de São Lourenço	3	63	4,76	15	63	23,80
Bom Jesus do Norte	0	38	0	12	38	31,57
Ibatiba	2	57	3,50	23	57	40,35
Dores do Rio Preto	5	84	5,95	35	84	41,66
São José do Calçado	2	45	4,44	19	45	42,22
Jerônimo Monteiro	8	137	5,83	58	137	42,33

Muniz Freire	4	75	5,33	32	75	42,66
Guaçuí	2	36	5,55	16	36	44,44
Irupi	3	35	8,57	16	35	45,71
Ibitirama	5	72	6,94	33	72	45,83
Alegre	11	143	7,69	72	143	50,34
Lúna	2	69	2,89	41	69	59,42
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>854</b>	<b>5,50</b>	<b>372</b>	<b>854</b>	<b>43,55</b>

(+) = número de animais positivos em pelo menos um teto; (n) = número de animais avaliados; (%) = prevalência de mastite clínica e subclínica.

Custos de aproximadamente R\$ 229,00 por cada caso de mastite clínica foram descritos (CARNEIRO et al., 2013). Em rebanhos com 100 vacas em lactação, produzindo em média 20Kg de leite e frequência de 7% de mastite clínica, podem apresentar custos anuais de até R\$ 160.000,00, incluindo perdas e despesas (LOPES et al., 2012). Portanto, é importante alertar os produtores, uma vez que a mastite é considerada uma das doenças mais importantes que acometem os rebanhos leiteiros, gerando prejuízos econômicos decorrentes da redução da produção, da qualidade do leite e do período de lactação (PEIXOTO, MOTA, COSTA, 2010).

Os índices de mastite subclínica variaram de 23,80% a 59,42% (Tabela 2). Prevalência de 47,68% para mastite subclínica foi relatada no município de Alegre (VIERA et al., 2013), enquanto no presente trabalho 50,34% foi encontrado para o mesmo município. Em trabalho realizado no estado do Rio de Janeiro, prevalência de 20,63% para mastite subclínica foi encontrada (CASTRO, SOUZA, BITTENCOURT, 2012).

Perdas econômicas estão relacionadas à mastite subclínica, podendo ser significativamente maiores quando comparadas às perdas com a mastite clínica (BOTARO, SANTOS, 2008). Neste contexto, a diminuição da produção com mastite subclínica pode representar até 2,8 litros/vaca/dia (VISSIO et al., 2015). Perdas econômicas para produtores do município de Jerônimo Monteiro, Espírito Santo, de R\$ 0,045 por litro de leite produzido foram relatadas, os autores alegaram que tais perdas eram decorrentes da baixa qualidade do leite produzido em relação à mastite (ULIANA et al., 2016).

Pode-se observar na Tabela 3, que existe associação significativa entre Leucose Enzoótica Bovina e a presença de mastite subclínica, mas não houve

associação de LEB com mastite clínica. Corroborando ao presente trabalho foi observada prevalência maior de mastite subclínica em animais portadores de leucose em comparação aos animais soronegativos (SANDEV et al., 2004).

Tabela 3: Associação entre Leucose Enzoótica Bovina e a presença de mastite clínica e mastite subclínica em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

	<b>Odds Ratio</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>Valor de p</b>
Mastite Clínica	1,85	0,97 - 3,51	0,05604
Mastite Subclínica	1,41	1,07 - 1,86	0,01348*

Valor de p obtido pelo teste de Qui-quadrado; \*Apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

No presente estudo, animais sororreagentes para LEB aumentaram as chances em até 1,37 vezes de apresentarem mastite subclínica. Diferente do encontrado no presente trabalho, foi detectada associação entre a LEB e mastite clínica ( $p=0,047$ ) por meio do teste de qui-quadrado em Minas Gerais, entretanto os resultados não permitiram afirmar que tal associação fosse fator que aumentasse ou diminuísse o risco, uma vez que o intervalo de confiança variou de 0,111 - 1,027 (AMBRÓSIO, 2015).

A associação entre leucose e mastite subclínica encontrada no presente trabalho pode ser explicada devido ao fato de animais positivos para LEB apresentarem imunossupressão, e com isso estariam mais predispostos a enfermidades secundárias (KAKINUMA et al., 2014; AZEVEDO et al., 2011). Os resultados encontrados corroboram com outros autores afirmando que animais positivos para LEB possuem maior predisposição para enfermidades infectocontagiosas como mastite (EMANUELSON et al., 1992).

Na Tabela 4 está a distribuição percentual das possíveis variáveis associadas à soroprevalência de LEB em vacas leiteiras mestiças na região do Caparaó, Espírito Santo. Como pode ser observado, a prevalência da leucose foi maior em propriedades que produzem mais leite. Das 69 propriedades avaliadas sete, 22 e 40 foram classificadas como pequena, média e grande produtora de leite respectivamente, e o número médio de vacas ordenhadas foi de seis, oito e 17 para propriedades pequena, média e grande respectivamente.

Tabela 4: Distribuição percentual das possíveis variáveis associadas à soroprevalência de Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

Variáveis	Animais testados	Animais sororreagentes à LEB	Prevalência LEB (%)
Nível de produção			
<b>Pequeno</b> (até 53 L)	41	20	<b>48,78</b>
<b>Médio</b> (de 54 a 133 L)	167	86	<b>51,49</b>
<b>Grande</b> (acima de 133 L)	646	379	<b>58,66</b>
Reutilização de agulhas descartáveis			
<b>Sim</b>	467	299	<b>64,02</b>
<b>Não</b>	387	186	<b>48,06</b>
Mortalidade bezerros alta			
<b>Sim</b>	52	39	<b>75,00</b>
<b>Não</b>	802	446	<b>55,61</b>
Problemas reprodutivos			
<b>Sim</b>	401	253	<b>63,09</b>
<b>Não</b>	453	232	<b>51,21</b>
Tipo de ordenha			
<b>Mecânica</b>	750	442	<b>58,93</b>
<b>Manual</b>	104	43	<b>41,34</b>
Manejo reprodutivo			
<b>Inseminação artificial</b>	521	308	<b>59,11</b>
<b>Monta natural</b>	333	177	<b>53,15</b>

Na Tabela 5 estão descritos os fatores que aumentam o risco em relação à Leucose Enzoótica Bovina encontrados no presente trabalho. Observa-se que a reutilização de agulhas descartáveis e a ordenha mecânica foram considerados como fatores de risco associados à LEB ( $p < 0,05$ ). Animais sororreagentes para LEB apresentaram maiores chances de manifestar alta mortalidade de bezerros e presença de problemas reprodutivos ( $p < 0,05$ ). O manejo reprodutivo por monta natural e o nível de produção não apresentaram significância estatística ( $p > 0,05$ ).

Tabela 5: Variáveis associadas à soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

	Odds Ratio	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p
<b>Reutilização de agulha descartável</b>	1,92	1,46 - 2,53	0,000002758*
<b>Ordenha Mecânica</b>	2,03	1,34 - 3,08	0,0006912*
<b>Mortalidade de Bezerros</b>	2,39	1,25 - 4,55	0,006234*

<b>Problemas Reprodutivos</b>	1,62	1,23 - 2,14	0,0004703*
<b>Monta Natural</b>	0,78	0,59 - 1,03	0,08618
<b>Nível produção (Pequeno)</b>	0,71	0,38 - 1,33	0,2900
<b>Nível produção (Médio)</b>	0,76	0,54 - 1,07	0,1236
<b>Nível produção (Grande)</b>	1,36	0,99 - 1,86	0,05099

Valor de p obtido pelo teste de Qui-quadrado; \*Apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

No presente estudo 32 (46,37%) das 69 propriedades avaliadas faziam a reutilização de agulhas descartáveis na aplicação de ocitocina, ou seja, 54,68% (467/854) dos animais avaliados recebiam ocitocina com o intuito de facilitar a ejeção do leite. Como observado a campo, os produtores utilizavam a mesma agulha e seringa em vários animais, fator este que pode ser considerado como um dos transmissores de LEB no rebanho. Portanto, deve-se alertar os produtores sobre o perigo da disseminação de doenças, não só de LEB por tal prática, para que o mesmo possa implementar na propriedade planos de prevenção e controle de enfermidades infectocontagiosas.

Sabe-se que dentre as principais formas de se evitar a disseminação de enfermidades de caráter infeccioso é o uso de seringas e agulhas individuais durante a vacinação ou protocolos terapêuticos. Alternativa ao uso de ocitocina injetável seria o uso da via vaginal (PESSÔA NETTO et al., 2019). Outras medidas podem ser adotadas para prevenção e controle da leucose como uso de luvas obstétricas individuais, uso de equipamentos descartáveis ou esterilização de instrumentos reutilizáveis e alimentar bezerros com colostro ou leite de vacas não infectadas (RODRÍGUEZ et al., 2011).

A ordenha do tipo mecânica foi considerada fator de risco aos animais avaliados no presente estudo, onde os animais ordenhados mecanicamente apresentaram até duas vezes mais chance de serem sororreagentes para LEB (Tabela 5). Corroborando ao presente trabalho, foi relatado no Tocantins maior soroprevalência de LEB em vacas onde os animais eram ordenhados mecanicamente em comparação à ordenha manual com 54% e 36,3% respectivamente (FERNANDES et al., 2009). A maior intensificação da produção associada à presença da ordenha mecânica pode favorecer a transmissão da enfermidade, uma vez que medidas de prevenção e controle não são implementadas na propriedade. Neste contexto, as deficiências no manejo, a

sanidade do úbere e a desinfecção e manutenção inadequada dos equipamentos de ordenha podem ser considerados como fatores que auxiliam a transmissão de doenças infectocontagiosas. Deve-se alertar os produtores sobre a falta de manutenção dos equipamentos de ordenha, visto que o excesso de vácuo por exemplo é considerado um dos principais fatores que propiciam o aparecimento de mastite, uma vez que pode causar danos ao esfíncter do teto, o que aumentam as chances de patógenos colonizarem a glândula mamária e causarem mastite (REIS et al., 2007).

Como pode ser observado na Tabela 5, rebanhos sororreagentes para o VLB apresentaram 2,3 vezes mais chances de manifestar mortalidade de bezerros. Para diminuir o risco de transmissão vertical, bezerros nascidos de mães positivas devem ser alimentados com colostro e leite de fêmeas negativas ou leite pasteurizado (ACAITE et al., 2007). Os animais sororreagentes para a leucose apresentaram 1,62 vezes mais chances de resultar em problemas reprodutivos. Neste contexto, as maiores perdas relacionadas à LEB estão ligadas a queda na produção leiteira e maior intervalo entre partos (D'ANGELINO, GARCIA, BIRGEL, 1998). Portanto, se faz necessário o diagnóstico de LEB no rebanho para posterior adoção de medidas necessárias para controle e possível eliminação da doença, evitando maiores prejuízos aos produtores da região.

No presente estudo não foi encontrada associação entre a LEB e manejo reprodutivo (monta natural ou inseminação artificial). Estudos realizados com materiais biológicos de importância reprodutiva como sêmen e óvulos provenientes de animais infectados pelo VLB, indicaram que tais materiais têm pouca importância na transmissão do agente (DIGIACOMO, 1992; JOHNSON, KANEENE, 1992). Não houve associação entre LEB e a classificação da propriedade de acordo com o nível de produção (Tabela 5). Esperava-se que propriedades com maior produção e número de animais fosse fator que aumentaria o risco para a leucose, uma vez que o maior contato entre os animais poderia favorecer a transmissão da enfermidade.

Diante dos resultados encontrados se faz necessário elaborar metas para a prevenção e redução da Leucose Enzoótica Bovina e da mastite, uma vez que as prevalências dessas enfermidades encontram-se elevadas na região estudada. Neste contexto, é importante ressaltar que todos os produtores atendidos no

presente estudo receberam laudos referentes ao diagnóstico realizado na propriedade e foram orientados a respeito dos métodos de transmissão e prevenção quanto à leucose e à mastite. Foi realizado também dia de campo para a divulgação dos resultados encontrados, com o intuito de atingir maior número de produtores na região.

O conhecimento das diversas condições que contribuem para a qualidade do leite é de grande importância para a escolha de estratégias adequadas de prevenção e controle, que devem fazer parte de um conjunto de ações destinadas a corrigir problemas detectados pelos diagnósticos participativos realizados pelos pesquisadores e produtores, que interferem direta ou indiretamente na pecuária leiteira da região. Assim, as informações encontradas no presente trabalho permitiram a identificação de pontos críticos no manejo, e tais deficiências acarretam em perdas produtivas pela ocorrência das enfermidades diagnosticadas.

É preciso alertar os produtores rurais por meio de informações sobre o controle das enfermidades, gerando assim maior rentabilidade de suas produções e qualidade dos produtos produzidos. Se faz necessário discussões junto aos produtores, associações, cooperativas e órgãos governamentais de qual o melhor sistema de manejo sanitário para a região, com melhor resposta econômica e social e posteriormente realizar a elaboração de medidas educativas e de implementação, por meio de assistência técnica especializada.

#### 4.1.6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o vírus da Leucemia Bovina encontra-se amplamente disseminado nos rebanhos bovinos leiteiros dos municípios que compreendem a região do Caparaó, Espírito Santo. As prevalências de mastite clínica e mastite subclínica também estão elevadas em determinados municípios estudados. A presença da Leucose Enzoótica Bovina aumenta as chances do desenvolvimento de mastite subclínica. A reutilização de agulhas descartáveis e o uso de ordenhadeira mecânica foram considerados fatores que aumentam o risco associado à Leucose Enzoótica Bovina. Animais sororreagentes para LEB apresentaram maiores chances

de manifestar alta mortalidade de bezerros e presença de problemas reprodutivos. Não foram encontradas relações entre o VLB e inseminação artificial, monta natural e nível de produção.

#### 4.1.7. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro, a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo desenvolvimento da pesquisa e oportunidade. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### 4.1.8. REFERÊNCIAS

ACAITE, J.; TAMOSIUNAS, V.; LUKAUSKAS, K.; MILIUS, J.; PIESKUS, J. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. **Preventive Veterinary Medicine**, v.82, n.2, p. 83-9, 2007.

ALEXANDRINO, B.; DIAS, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; AFFONSO, I. B.; PEREIRA, G. T.; SAMARA, S. I. Herpesvírus bovino associado à diarreia viral bovina e à leucose enzoótica bovina. **Ars Veterinária**, v. 27, n. 3, p. 168-174, 2011.

AMBRÓSIO, N. A. Intercorrência da Leucose Enzoótica Bovina e Mastite em vacas leiteiras naturalmente infectadas. 2015. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

ASSIS, H. A.; BARIONI, G.; STARLING, R. Z. C.; DONATELE, D. M. Ocorrência da Leucose Enzoótica no gado bovino abatidos sob Inspeção estadual no Estado do Espírito Santo no ano de 2013. **Pubvet**, v. 9, n. 4, p. 163-168, 2015.

AZEDO, M. R.; BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.1131-1140, 2011.

BARROS, G. S. A. C.; GALAN, V. B.; GUIMARÃES, V. A.; BACCHI, M.R.P. **Sistema agroindustrial do leite no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 172p, 2001.

BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. K.; SPNCHIADO, D.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V.; OLLHOFF, R. D.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, A. W. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da Leucose Enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 511-515, jul./set. 2010.

BOTARO, B.; SANTOS, M. V. O impacto silencioso da mastite subclínica. Disponível em: < <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/o-impactosilencioso-da-mastite-subclinica-46148n.aspx>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2017.

CAMARGOS, M. F.; MELO, C. B.; LEITE, R. C.; STANCEK, D.; LOBATO, Z. I. P.; ROCHA, M. A.; SOUZA, G. N.; REIS, J. K. Frequência de soropositividade para a Leucose Enzoótica ovina em rebanhos de Minas Gerais. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v.5, p.20-26, 2002.

CARNEIRO, A. V.; STOCK, L. A.; CARNEIRO, A. V.; STOCK, L. A.; ZOCCAL, R.; CARVALHO, G. R.; MARTINS, P. C.; YAMAGUCHI, L. C. T. Mastite clínica: prevalência e custo de tratamento em rebanho leiteiro. **Pecuária de Leite**, 2013. Disponível em: [http://www.cileite.com.br/sites/default/files/mastite\\_clinica\\_prevalencia\\_e\\_custo\\_de\\_tratamento\\_em\\_rebanho\\_leiteiro.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/mastite_clinica_prevalencia_e_custo_de_tratamento_em_rebanho_leiteiro.pdf). Acesso em: 20 de abril de 2019.

CASTRO, B. G.; SOUZA, M. M. S.; BITTENCOURT, A. J. Prevalência e etiologia da mastite subclínica na região sul fluminense. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v.10, n. 3, p.263-268, jul./set., 2012.

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

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Disponível em: [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com), Acessado em 10/04/2019.

DEL-FAVA, C.; PITUCO, E. M. Infecção pelo vírus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. **Biológico**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2004.

DIGIACOMO, R.F. Horizontal transmission of the bovine leukemia virus. **Veterinary Medicine Journal**, n. 3, p. 263-270, 1992.

EMANUELSON, U.; SCHERLING, K.; PETTERSSON, H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 12, n. 1-2, p. 121-131, 1992.

ERSKINE, R.; CORL, C.; GANDY, J. C.; SORDILLO, L. Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, p. 1059–1064, 2011.

FERNANDES, C. H. C. Leucose Enzoótica dos bovinos: soroprevalência, fatores de risco e níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros do Estado do Tocantins, Brasil. 2007. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2007.

FERNANDES, C. H. C.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G.; MENDES, E. I.; FERNANDES, A. C.; RAMALHO, T. R. R.; MOURA SOBRINHO, P. A.; MOTA, R. A. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região Norte do estado do Tocantins, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.3, p.327-334, 2009.

FLORINS, A.; BOXUS, M.; VANDERMEERS, F.; VERLAETEN, O.; BOUZAR, A. B.; DEFOICHE, J.; HUBAUX, R.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 125, n. 1/2, p. 1-7, sept. 2008.

FRIE, M. C.; COUSSENS, P. M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n.3, p.103-114, 2014.

GARCIA, M.; BASTOS, P. A. S.; BARROS FILHO, I. R.; LIBERA, A. M. M. P. D.; COUTINHO, S. D. A.; RAMOS, M. C. C.; LOURENÇO, A.; SILVA, M. M. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 15, n. 88, p. 41-44, 1995.

IBGE, 2019. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2015. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=9108&t=resultados>> Acesso em 20 de abril de 2019.

JOHNSON, R.; KANEENE J.B. Bovine Leukaemia Vírus and Enzootic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-312, 1992.

KAKINUMA, S.; MARDÁ, Y.; OHTSUKA, H.; KONNAI, S.; OIKAWA, M. Bovine Leukemia virus titer and leukocyte population associated with mastitis in periparturient dairy cows. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 12, n. 3, p. 239-244, 2014.

LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; ROCHA, C. M. B. M.; COSTA, G. M.; FRANCO NETO, A.; SANTOS, G. Avaliação do Impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 79, n.4, p. 477-483, 2012.

MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de ELISA e imunodifusão em gel de Agar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n.3, p. 171-179, 2005.

MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; KURODA, R. B. S.; CRUZ, T. F.; LIMA, K. C. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.5, p. 645-646, 2003.

MENDES, E. I.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. S.; SÁ, L. M.; SOUTO, R. J. C.; FERNANDES, A. C. C.; SANDES, H. M. M.; SILVA, T. I. B. Intercorrência entre Leucose Enzoótica Bovina e Tuberculose em bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.1-8, 2011.

OIE, 2009. World Animal Health Information Database - Version: 1.4. World Animal Health Information Database. Paris, France: World Organisation for Animal Health. Disponível em: <https://www.oie.int>, Acesso em: 07 de maio de 2019.

OLIVEIRA, A. J.; MORAES, G. F.; FERREIRA, I. C.; MONTEIRO, C. P.; CARVALHO, A. D. F. Mastite clínica e subclínica em pequenas propriedades leiteiras no município de Araguari – MG. **Veterinária Notícias**, v. 19, n. 1, p. 7-13, 2013.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MEDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. A.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. Pesquisa **Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011.

PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 9, p. 754-762, 2010.

PESSÔA NETTO, C. L. M.; SATURNINO, H. M.; PAES, P. R. O.; DUARTE, I. D. G; KELLER, K. M; VIANA, F. A. B. Utilização da ocitocina em gado girolando: avaliação da via vaginal como alternativa à via endovenosa. **Ciência Animal Brasileira**, v.20, pg 1-9, 2019.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Jaguariuna: Westfalia Landteclinic do Brasil, 2002. 192p.

PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SOUZA, M. E.; PORTO, W. J. N.; LIRA, N. S. C.; MOTA, R.. Epidemiologia da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 14, n. 2, p. 258-264, abr./jun. 2013.

POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZÁLES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de Brucelose, Tuberculose e Infecções Víricas em Bovinos Leiteiros do Município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

RAJÃO, D. S. Efeito da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros. 2008. 26p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2008.

RAJÃO, D. S.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Leucose Enzoótica Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 64, p. 60-72, 2012.

RAJÃO, D. S.; HEINEMANN, M. B.; REIS, J. K. P.; BRAZ, G. F.; HADDAD, J. P. A.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LEITE, R. C. Effects of bovine leukemia virus infection on crossbred and purebred dairy cattle productive performance in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p.891-900, 2014.

RAMOS, G. B.; GOMES, D. O.; SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; LIMA, A. M. C. Intercorrência entre leucose enzoótica bovina e tuberculose bovina em bovinos abatidos em frigorífico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 1-5, p. 1-5, 2016.

RAVAZAZOLLO, A.P.; COSTA, U. Retroviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. p. 809-838.

REIS, G. L.; ALVES, A. A.; LANA, A. M. Q.; COELHO, S. G.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; PENNA, C. F. A. M.; MENDES, E. D. M. Procedimento de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1134-1138, 2007.

RODRÍGUEZ, S. M.; FLORINS, A.; GILLET, N.; BROGNIEZ, A.; SÁNCHEZALCARAZ, M. T.; BOXUS, M.; BOULANGER, F.; GUTIÉRREZ, G.; TRONO, K.; ALVAREZ, I.; VAGNONI, L.; WILLEMS, L. Preventive and therapeutic strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1210-1248, 2011.

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 13, p. 107-111, 1981.

SANDEV, N.; KOLEVA, M.; BINEV, R.; ILIEVA, D. Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. **Veterinarski Archiv**, v. 74, n. 6, p. 411-416, 2004.

STARLING, R. Z. C.; BEZERRA, A. O.; SALARDANE, I.; FERREIRA, P. G.; CLIPES, R. C.; DONATELI, D. M. Soroepidemiologia da leucose enzoótica bovina em propriedades leiteiras do município de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 6, n. 12, p.427-441, 2013.

ULIANA, R. D.; CASTRO, J. B. P.; DIETRICH, W. S.; FRANCO, M. C.; CLIPES, R. C.; BARIONI, G.; DONATELE, D. M. Perdas econômicas em função da baixa qualidade do leite produzido no município de Jerônimo Monteiro, Espírito Santo. In: XIII Semana de Educação Continuada em Medicina Veterinária, 2016, Alegre, Anais... Alegre/ES,2016. Disponível em: [http://medicinaveterinaria.alegre.ufes.br/sites/medicinaveterinaria.alegre.ufes.br/files/field/anexo/anais\\_xiii\\_secomv\\_2016.pdf](http://medicinaveterinaria.alegre.ufes.br/sites/medicinaveterinaria.alegre.ufes.br/files/field/anexo/anais_xiii_secomv_2016.pdf)>. Acesso em: 20 de abril de 2019.

VISSIO, C.; AGUERO, D. A.; RAWSPANTI, C. G.; ODIERNO, L. M.; LARRIESTRA, A. J. Pérdidas productivas y económicas diárias ocasionadas por la mastites y erogaciones derivados de su control em establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 47, n. 1, p. 7-14, 2015.

VIEIRA, B. C. R.; LORENZONI, L. S.; SOUZA, M. H.; ALFAIATE, M. B.; XAVIER, T. M. T. Etiologia infecciosa associada à mastite subclínica em bovinos de propriedades rurais no município de Alegre-ES. **Enciclopédia Biosfera**. v.9, n.16, p.1154-1172, 2013.

## 4.2. CAPÍTULO 2 - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA

Seroprevalence and risk factors associated with Infectious Bovine Rhinotracheitis

### 4.2.1. RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a soroprevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) nos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo (ES), a possível relação entre IBR e ocorrência de mastite e os fatores de risco associados à IBR. Foram utilizadas 854 vacas mestiças de aptidão leiteira provenientes de 69 propriedades localizadas nos 12 municípios que compõem a região, entre os meses de fevereiro a julho de 2015. Amostras de sangue foram coletadas para a determinação da soroprevalência da IBR por meio do teste de ELISA indireto. A detecção de mastite clínica foi determinada por meio do teste da caneca de fundo preto e a mastite subclínica foi diagnosticada através do California Mastite Teste. As variáveis avaliadas foram reutilização de agulha descartável, tipo de ordenha, manejo reprodutivo, mortalidade de bezerros, presença de problemas reprodutivos, realização de teste para brucelose e nível de produção. Os resultados foram demonstrados por meio de análise descritiva e as associações entre as variáveis foram estimadas pelo Odds Ratio (OR) e intervalo de 95% de confiança. O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar a significância das associações ( $p < 0,05$ ). A prevalência média de IBR para a região foi de 48,59%, variando entre 20,63 a 65,21%. Houve associação positiva entre IBR e a presença de mastite subclínica ( $p < 0,05$ ; OR=1,53; IC=1,16-2,00). O manejo reprodutivo por monta natural (OR=1,49; IC=1,13-1,96) e a ordenha mecânica (OR=2,12; IC=1,37-3,28) foram considerados fatores de risco para a IBR ( $p < 0,05$ ). Problemas reprodutivos, mortalidade de bezerros, reutilização de agulhas descartáveis, teste de brucelose e nível de produção não apresentaram associação com a IBR. Conclui-se que a IBR encontra-se disseminada nos rebanhos de leite dos municípios da região do Caparaó Capixaba. A presença de IBR aumenta as chances do animal apresentar mastite subclínica. A monta natural e a ordenha mecânica foram considerados fatores predisponentes à infecção pelo vírus da IBR.

**Palavras-chave:** ELISA indireto, IBR; mastite, vacas mestiças.

#### 4.2.2. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the seroprevalence of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in the municipalities of Caparaó, Espírito Santo (ES), the possible relationship between IBR and occurrence of mastitis and risk factors associated with IBR. A total of 854 crossbred dairy cows from 69 farms located in the 12 municipalities that make up the region were used between February and July 2015. Blood samples were collected to determine IBR seroprevalence by indirect ELISA. Detection of clinical mastitis was determined by the black bottom mug test and subclinical mastitis was diagnosed by the California Mastitis Test. The variables evaluated were reuse of disposable needle, type of milking, reproductive management, calf mortality, presence of reproductive problems, brucellosis test and production level. Results were demonstrated by descriptive analysis and associations between variables were estimated by Odds Ratio (OR) and 95% of confidence interval. The chi-square test was used to verify the significance of the associations ( $p < 0.05$ ). The average prevalence of IBR for the region was 48.59%, ranging from 20.63 to 65.21%. There was a positive association between IBR and the presence of subclinical mastitis ( $p < 0.05$ ; OR = 1.53; CI = 1.16-2.00). Reproductive management by natural breeding (OR = 1.49; CI = 1.13-1.96) and mechanical milking (OR = 2.12; CI = 1.37-3.28) were considered risk factors for IBR ( $p < 0.05$ ). Reproductive problems, calf mortality, reuse of disposable needles, brucellosis test and production level were not associated with IBR. In conclusion, IBR is widespread in the dairy herds of the municipalities of the Caparaó Espírito Santo's region. The presence of IBR increases the chances of the animal presenting subclinical mastitis. Natural breeding and mechanical milking were considered predisposing factors for IBR virus infection.

**Keywords:** crossbred cows, IBR, indirect ELISA, mastitis.

### 4.2.3. INTRODUÇÃO

O Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BHV-1) é o agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e encontra-se disseminado no mundo em rebanhos de leite e corte, sendo responsável por prejuízos econômicos na bovinocultura. Os isolados de BHV-1 foram classificados em três subtipos que podem causar uma série de condições clínicas nos bovinos, incluindo vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IPB), aborto, infertilidade, conjutivite, doenças respiratórias, encefalite, mastite, enterite e dermatite (STRAUB, 2001).

A prevalência de IBR é variada, encontrando 35,9% na Bélgica (BOELAERT et al., 2000), Itália 77,5% (RINALDI et al., 2007), Inglaterra 69,2% (PATON et al., 1998), China 35,8% (YAN et al., 2008), Uruguai 37% (GUARINO et al., 2008), Peru 51% (STAHL et al., 2002) e Equador 82,1% (CARBONERO et al., 2011). No Brasil, há relatos de 17% em rebanhos do Mato Grosso do Sul (PELLEGRIN et al., 1997), Goiás 83% (VIEIRA et al., 2003), São Paulo 68,3% (JUNQUEIRA et al., 2006) e Minas Gerais 58,2% (ROCHA et al., 2001). No estado do Espírito Santo existe apenas um estudo com prevalência média de 66,75% (SANTOS et al., 2014).

Embora seja mais provável a infecção pelo BHV-1 seguir um curso subclínico, ocasionalmente a IBR pode causar significativa mortalidade. Uma taxa de mortalidade de 3% foi relatada na Califórnia (GRAHAM, 2013) e estudos de modelagem na Holanda consideraram taxa de mortalidade em torno de 2% entre animais clinicamente afetados (NOORDEGRAAF et al., 2000).

Perdas econômicas estão relacionadas à presença de IBR nos rebanhos. No Reino Unido foram estimadas perdas de 3,1 milhões de libras em 2005, sendo estas representadas principalmente por mortalidade, abate prematuro e perda de peso dos animais (BENNET, IJPELAAR, 2005). Além da redução na produção de leite, foram relatados efeitos sobre a fertilidade e mortalidade de bezerras (SAYERS, 2017). Perdas devido à queda na produção de leite estão associadas à infecção subclínica da IBR, onde perdas de aproximadamente 9,5 litros de leite foram estimadas durante 14 dias em rebanho com 98 animais em lactação (HAGE et al., 1998). Perdas de 2,6 Kg/leite/dia em vacas com IBR subclínica em comparação com vacas soronegativas

foram relatadas (STATHAM et al., 2015). Em estudo realizado na Turquia foram encontradas reduções de 10% e 9% para produção de leite e peso vivo respectivamente, quando comparado animais soropositivos e soronegativos (CAN, ATASEVEN, YALÇIN, 2016). Os autores relataram ainda que o prejuízo financeiro devido à infecção foi estimado em U\$ 331 caso não ocorra aborto e U\$ 509 se o aborto ocorrer como resultado da infecção por BHV-1.

As técnicas sorológicas mais utilizadas na detecção de anticorpos contra IBR incluem a Soroneutralização (SN) e o ELISA. A SN tem alta sensibilidade e especificidade, no entanto, por depender da manutenção de cultivos celulares, maior infraestrutura e tempo gasto no processamento da técnica, possui maior custo quando comparado ao ELISA (WYLER et al., 1989). Estudos demonstram que o teste de ELISA indireto tem sido aplicado na detecção de anticorpos contra o BHV-1, apresentando elevada concordância com a soroneutralização, sendo capaz de detectar baixos títulos de anticorpos nos animais infectados, além da rapidez e fácil execução (MÉDICI, ALFIERI, ALFIERI, 2000; PERRIM, PERRIM, MOUSSA, 1996).

Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a soroprevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina nos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo, a possível relação entre IBR e mastite e traçar os fatores de risco associados à IBR.

#### 4.2.4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso em Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o número de protocolo 003/2015 e CEUA UFES Alegre sob o número de protocolo 008/2018.

Foram utilizadas 854 vacas mestiças (*Bos tauros tauros* x *Bos taurus indicus*) de aptidão leiteira, clinicamente saudáveis, em diferentes fases de lactação provenientes de propriedades localizadas nos 12 municípios que compõem a Microrregião do Caparaó Capixaba (20° 26' 5" S e 41° 47' 2" O), no Sul do Espírito Santo (Alegre, Bom Jesus do Norte, Divino de São Lourenço, Dores do Rio Preto,

Guaçuí, Ibatiba, Ibitirama, Irupi, Iúna, Jerônimo Monteiro, Muniz Freire e São José do Calçado), no período de fevereiro a julho de 2015. No total foram avaliadas ao acaso 69 propriedades, sendo cinco propriedades avaliadas por município, com exceção de Alegre com nove e Jerônimo Monteiro, onde dez propriedades foram avaliadas.

Amostras de sangue total foram coletadas de todas as vacas em lactação por meio de punção da veia coccígea média em sistema de coleta a vácuo. O sangue colhido foi acondicionado em tubos sem anticoagulante e transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório de Produção Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo. Após colheita, as amostras foram centrifugadas a 200 G durante 5 minutos para a obtenção do soro, o qual foi fracionado em tubos de polietileno de 1,5 mL e armazenados a menos 80 °C. O exame para diagnóstico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina foi realizado através do teste de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto) utilizando kit CIVTEST® BOVIS IBR (Amer, Catalunha, Espanha), segundo as recomendações do fabricante.

A detecção de mastite clínica foi determinada por meio da identificação dos sinais clínicos de inflamação da glândula mamária e pelo teste da caneca de fundo preto. A mastite subclínica foi diagnosticada por meio do California Mastite Teste (CMT). O animal foi considerado positivo para mastite clínica ou subclínica quando houve alteração ao teste da caneca ou CMT respectivamente, em pelo menos um teto.

As variáveis analisadas foram prevalência de IBR, a possível relação entre IBR e mastite, bem como o questionário referente à reutilização de agulhas descartáveis (sim/não), fazia teste para brucelose (sim/não), tipo de ordenha (manual/mecânica), manejo reprodutivo (inseminação artificial/monta natural), mortalidade de bezerros alta (sim/não) e se a propriedade apresentava problemas reprodutivos (sim/não). As propriedades foram classificadas em pequenas, médias e grandes produtoras de leite com respectivas produções de até 53 litros, de 54 a 133 e acima de 133 litros de leite por dia (BARROS et al., 2001).

O cálculo do número amostral foi realizado de acordo com a fórmula abaixo:

$$n = def f \times \frac{Npq}{\frac{d^2}{1,96^2} (n - 1) + pq}$$

Onde:

$n$  = tamanho da amostra;

$def f$  = efeito do design;

$N$  = tamanho da população;

$p$  = proporção estimada;

$q = 1 - p$ ;

$d$  = nível de precisão absoluto.

Utilizando frequência antecipada de 50% para IBR, limite de confiança de 5%, intervalo de confiança de 99% e efetivo bovino do estado do Espírito Santo de 2.223.531 cabeças de gado no ano do estudo (IBGE, 2019), o número mínimo para o tamanho amostral calculado foi de 664 animais. Portanto, o tamanho amostral do presente estudo de 854 animais proporciona representatividade estatística.

Os resultados estatísticos foram demonstrados por meio de análise descritiva e as associações entre as variáveis foram estimadas pela razão dos produtos cruzados - Odds Ratio (OR) e intervalo de 95% de confiança. O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar a significância das associações ( $p < 0,05$ ). Os cálculos foram realizados no programa OpenEpi 3.01 (DEAN, SULLIVAN, SOE, 2013).

#### 4.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está descrita a prevalência para Rinotraqueíte Infecciosa Bovina nos municípios que compõem a região do Caparaó, estado do Espírito Santo (ES). Como pode ser observado, foi encontrada prevalência média de 48,59% (415/854). Houve grande variação na prevalência de IBR (20,63 a 65,21%) nos municípios estudados do Espírito Santo. Variação também foi encontrada em outros

levantamentos com bovinos de leite nas regiões do estado do Paraná (47,2 a 99%), onde o exame de ELISA indireto também foi empregado (DIAS et al., 2013).

Tabela 1: Soroprevalência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) pelo teste de ELISA indireto em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

<b>Município</b>	<b>Animais reagentes</b>	<b>Animais não reagentes</b>	<b>Total</b>	<b>Prevalência de IBR (%)</b>
Divino de São Lourenço	13	50	63	20,63
Guaçuí	12	24	36	33,33
Ibatiba	19	38	57	33,33
Muniz Freire	27	48	75	36,00
Jerônimo Monteiro	66	71	137	48,17
Irupi	17	18	35	48,57
Ibitirama	35	37	72	48,61
Dores do Rio Preto	44	40	84	52,38
Bom Jesus do Norte	21	17	38	55,26
São José do Calçado	25	20	45	55,55
Alegre	91	52	143	63,63
Iúna	45	24	69	65,21
<b>Total</b>	<b>415</b>	<b>439</b>	<b>854</b>	<b>48,59</b>

Amostras coletadas entre 2007 e 2008 no Espírito Santo, provenientes de rebanhos leiteiros e utilizando a técnica de neutralização viral, prevalência de 49,6%, 62,15%, 67,21% e 80,04% para as regiões metropolitana, sul, norte e noroeste respectivamente, foram relatadas. Os autores relatam alta prevalência de amostras sororreagentes para o município de Alegre (90,9%), valores superiores ao encontrado no presente trabalho (SANTOS et al., 2014).

Corroborando ao presente trabalho, prevalência de 51,9% em Goiás foi relatada (BARBOSA, BRITO, ALFAIA, 2005). Em contrapartida, há relatos de prevalência de 71,5% em vacas de leite no Paraná (DIAS et al., 2013) e 74,7% no estado de Goiás (VIEIRA et al., 2003), índices superiores ao do presente trabalho. Utilizando a técnica de virusneutralização, prevalência de 62,5% foi encontrada em Uberlândia, Minas Gerais (NASCIUTTI, 2017). No Brasil não há programa oficial para o controle da IBR, e a alta prevalência da infecção pelo BHV-1 em rebanhos leiteiros no Espírito Santo juntamente com as perdas econômicas causadas pela

infecção viral, demonstram a necessidade de ações de prevenção que contribuam para a redução da exposição à enfermidade.

Pode-se observar na Tabela 2, que houve associação significativa entre Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e a presença de mastite subclínica. Neste contexto, animais sororreagentes para IBR possuem 1,53 vezes mais chances de serem positivos para mastite subclínica. Entretanto, não houve associação entre IBR e a presença de mastite clínica.

Tabela 2: Associação entre Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e a presença de mastite clínica e mastite subclínica em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

	<b>Odds Ratio</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>Valor de p</b>
Mastite Clínica	1,11	0,61 - 1,99	0,7276
Mastite Subclínica	1,53	1,16 - 2,00	0,002147*

Valor de p obtido pelo teste de Qui-quadrado; \*Apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Estudos demonstram que o BHV-1 foi isolado de amostras de leite com mastite, sendo estas amostras negativas para cultura bacteriana, no entanto a evidência de que o vírus causou a mastite é apenas circunstancial (BILGE, 1998). Alta incidência de casos de mastite em rebanhos infectados pelo BHV-1 foi relatada, os autores sugeriram uma possível associação entre o vírus e a mastite, uma vez que após a imunização contra a IBR houve controle efetivo da mastite (SIEGLER et al., 1984). Ao examinar o efeito da infecção pelo BHV-1 na qualidade do leite em bovinos, foi encontrada associação significativa entre o vírus e a contagem de células somáticas (CCS), sugerindo que o patógeno não diminui apenas a produção de leite do rebanho como afetou também a qualidade do leite produzido (ROLA et al., 2015).

Outro fator que poderia estar associado à mastite seria as propriedades imunossupressoras do BHV-1, desempenhando papel secundário na etiologia de doenças causadas por bactérias (KOPPERS-LALIC et al., 2001; HUTCHINGS et al., 1990). Por induzir infecções latentes, uma vez infectado, o hospedeiro continua sendo reservatório do vírus por toda a vida (GRAHAN, 2013). Contudo, existe uma falta de conhecimento em relação ao impacto real do vírus na saúde do úbere de vacas, não havendo evidências suficientes para incluir ou não os efeitos dos vírus

em relação à mastite. Todavia, deve-se avaliar o possível impacto dos vírus no desenvolvimento da mastite, desta forma é importante considerar ações para diagnosticar e controlar as doenças virais.

Na Tabela 3 está a distribuição percentual das possíveis variáveis associadas à soroprevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em vacas leiteiras mestiças na região do Caparaó, Espírito Santo.

Tabela 3: Distribuição percentual das possíveis variáveis associadas à soroprevalência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

Variáveis	Animais testados	Animais sororreagentes à IBR	Prevalência IBR (%)
Nível de produção			
<b>Pequeno</b> (até 53 L)	41	20	<b>48,78</b>
<b>Médio</b> (de 54 a 133 L)	167	87	<b>52,09</b>
<b>Grande</b> (acima de 133 L)	646	308	<b>47,67</b>
Reutilização de agulha descartável			
<b>Sim</b>	467	238	<b>50,96</b>
<b>Não</b>	387	177	<b>45,73</b>
Mortalidade bezerros alta			
<b>Sim</b>	52	30	<b>57,69</b>
<b>Não</b>	802	385	<b>48,00</b>
Problemas reprodutivos			
<b>Sim</b>	401	194	<b>48,37</b>
<b>Não</b>	453	221	<b>48,78</b>
Faz teste de brucelose			
<b>Sim</b>	432	197	<b>45,60</b>
<b>Não</b>	422	218	<b>51,65</b>
Tipo de ordenha			
<b>Mecânica</b>	750	381	<b>50,80</b>
<b>Manual</b>	104	34	<b>32,69</b>
Manejo reprodutivo			
<b>Inseminação artificial</b>	521	233	<b>44,72</b>
<b>Monta natural</b>	333	182	<b>54,65</b>

Na Tabela 4 estão descritos os fatores que aumentam o risco em relação à Rinotraqueíte Infecciosa Bovina. Como pode ser observado, a monta natural e a ordenha mecânica foram considerados como fatores que aumentam o risco associado à IBR. A presença de problemas reprodutivos, mortalidade de bezerros,

reutilização de agulhas descartáveis, teste de brucelose e o nível de produção não apresentaram significância estatística ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4: Variáveis associadas à soroprevalência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

	<b>Odds Ratio</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Monta Natural</b>	1,49	1,13 - 1,96	0,004616*
<b>Ordenha Mecânica</b>	2,12	1,37 - 3,28	0,0005353*
<b>Problemas Reprodutivos</b>	0,98	0,75 - 1,29	0,9055
<b>Mortalidade de Bezerros</b>	1,47	0,83 - 2,60	0,1758
<b>Reutilização de agulha descartável</b>	1,23	0,94 - 1,61	0,1282
<b>Teste de Brucelose</b>	0,78	0,59 - 1,02	0,07664
<b>Nível produção (Pequeno)</b>	1,00	0,53 - 1,88	0,9806
<b>Nível produção (Médio)</b>	1,19	0,84 - 1,67	0,3149
<b>Nível produção (Grande)</b>	0,86	0,62 - 1,17	0,3448

Valor de p obtido pelo teste de Qui-quadrado; \*Apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

De acordo com o presente estudo, o manejo reprodutivo por monta natural (MN) aumentou as chances em 1,49 vezes do animal ser sororreagente para IBR (Tabela 4). Resultado semelhante foi encontrado por outros autores (NASCUTINI, 2017; DIAS et al., 2013; ROCHA, GOUVEIA, LEITE, 1999). A mucosa do prepúcio e a uretra são locais no qual há grande replicação viral, e desta forma o touro sororreagente pode ser responsável por disseminar a doença dentro do plantel (VAN DER ENGELENBURG et al., 1993). Portanto, é importante que nas propriedades onde ocorra a monta natural (29/69), todo o rebanho seja diagnosticado para IBR, sobretudo os touros utilizados na reprodução, evitando assim que estes transmitam a enfermidade para os animais sadios.

Outros autores não encontraram associação entre a IBR e o manejo reprodutivo (BEZERRA et al., 2012). É importante ressaltar que as centrais de inseminação devem certificar-se que os touros são negativos para o BVH-1, uma vez que o sêmen proveniente destas podem ser fontes de disseminação da doença, pois o vírus da IBR mantém sua viabilidade no sêmen congelado por até um ano (ROCHA, GOUVEIA, LEITE, 1999). Neste contexto, foram relatados 21,73% (5/23) de amostras positivas para IBR em sêmen congelado proveniente de centrais no estado do Rio Grande do Sul utilizando a técnica PCR (OLIVEIRA et al., 2011).

Contudo, devido aos padrões rígidos de controle e qualidade utilizados atualmente nas centrais de sêmen, tais critérios podem ser apontados como o principal motivo para que tenha ocorrido prevalência menor de IBR nas propriedades onde se realizava a inseminação artificial (Tabela 3).

No presente estudo, a ordenha mecânica foi considerada um fator de risco para a IBR, tendo os animais provenientes desse tipo de manejo apresentado risco de infecção duas vezes maior que os animais que eram ordenhados manualmente. Resultado semelhante foi encontrado em Minas Gerais (NASCIUTTI, 2017). Uma das explicações da ordenha mecânica ser considerado um fator de risco para IBR seria as circunstâncias de que o BHV-1 é eliminado no leite (BILGE, 1998). Neste contexto as deficiências no manejo, a sanidade do úbere e a desinfecção e manutenção inadequada dos equipamentos de ordenha mecânica podem ser considerados como fatores que auxiliam na transmissão de doenças infectocontagiosas. Diferente do presente estudo, não foi encontrada associação ao avaliar o tipo de ordenha e a presença de IBR (BARBOSA, BRITO, ALFAIA, 2005).

Não houve associação entre a presença de problemas reprodutivos, segundo relato dos proprietários, e IBR. Das 69 propriedades avaliadas 31 (44,92%) afirmaram haver problemas reprodutivos, sendo o aborto (15), a repetição de estro (8), a retenção de placenta (4) e a infecção uterina (4) os mais citados. Corroborando ao presente trabalho, não foi encontrada associação entre IBR e sinais reprodutivos ou casos de abortamento (BEZERRA et al., 2012; BARBOSA, BRITO, ALFAIA, 2005).

No presente trabalho não houve associação entre IBR e mortalidade de bezerros, reutilização de agulhas descartáveis, teste para brucelose e nível de produção. Poucas propriedades relataram a mortalidade de bezerros (6/69), podendo ser esse fator considerado para a não associação com a enfermidade. Esperava-se que a reutilização de agulhas descartáveis fosse considerado fator de risco para IBR, uma vez que há relatos que tal procedimento está associado com outras enfermidades infectocontagiosas como a Leucose Enzoótica Bovina (VÁSQUEZ et al., 2016). No entanto, esses mesmos autores também não encontraram associação com a reutilização de agulhas descartáveis e a presença de IBR.

Pode-se perceber que em propriedades que realizavam o teste de brucelose houve menor prevalência de IBR (Tabela 3), mas não houve associação entre a realização da prática, ou não, em relação à enfermidade. Ações como diagnóstico, prevenção e redução da exposição do rebanho às enfermidades infectocontagiosas contribuem para que o sistema imunológico funcione adequadamente, minimizando desta forma as perdas econômicas no sistema de produção. Porém, vários fatores interferem na eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos, sobretudo a ocorrência de tais doenças no rebanho. Portanto, deve-se minimizar a exposição do rebanho às enfermidades infectocontagiosas, para que se possa proporcionar maior rentabilidade para o produtor.

#### 4.2.6. CONCLUSÃO

Diante dos dados encontrados conclui-se que o Herpesvírus Bovino tipo 1 encontra-se amplamente disseminado nos rebanhos bovinos leiteiros dos municípios que compreendem a região do Caparaó, Espírito Santo. Constatou-se que a presença de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina aumenta as chances do animal apresentar mastite subclínica concomitantemente. O uso de ordenhadeira mecânica e o manejo reprodutivo por monta natural foram considerados fatores de risco associados à Rinotraqueíte Infecciosa Bovina. Não foram encontradas relações entre o BHV-1 e problemas reprodutivos, mortalidade de bezerros, teste de brucelose, reutilização de agulhas descartáveis e nível de produção.

#### 4.2.7. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro, a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo desenvolvimento da pesquisa e oportunidade. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### 4.2.8. REFERÊNCIAS

BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. B.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, nov-dez, 2005.

BARROS, G. S. A. C.; GALAN, V. B.; GUIMARÃES, V. A.; BACCHI, M.R.P. **Sistema agroindustrial do leite no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 172p, 2001.

BENNETT, R.; IJPELAAR, J. Updated estimates of the costs associated with thirty four endemic livestock diseases in Great Britain: a note. **Journal of Agricultural Economics**, v. 56, p. 135–144, 2005.

BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros no estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 158-162, 2012.

BILGE, S. Detection of antibodies of IBR-IPV infection in blood and milk by serum neutralization test and virus isolation from milk samples in dairy cows. **Veteriner Fakultesi Dergisi**, Ankara Turkey 45, 313–321, 1998.

BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J. P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOFS, P. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p. 285–295, 2000.

CAN, M. F.; ATASEVEN, V. S.; YALÇIN, C. Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV1) infection. **Veterinay Arhiv**, v.86, p. 499-513, 2016.

CARBONERO, A.; SAA, L. R.; JARA, D.V.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; ARENAS, A.; BORGE, C.; PEREA, A. Seroprevalence and risk factors associated to bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non- vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, p. 84–88, 2011.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, 2013. Disponível em: [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com), Acessado em 10/04/2019.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; FERREIRA-NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S.; MULLER, E. E. Seroprevalence and risk factors of Bovine Hesperivirus 1 infection cattle herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, p. 39-47, 2013.

GRAHAM, D. A. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle-a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. **Irish Veterinary Journal**, v. 66, p. 1-11, 2013.

GUARINO, H.; NUNEZ, A.; REPISO, M. V.; GIL, A.; DARGATZ, D. A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, p.34–40, 2008.

HAGE, J. J.; SCHUKKEN, Y. H.; DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; VAN VALKENGOED, P. H.; WENTINK, G. H. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 34, p. 97–106, 1998.

HUTCHINGS, D. L.; CAMPOS, M.; QUALTIERE, L.; BABIUK, L.A. Inhibition of antigen-induced and interleukin 2-induced proliferation of bovine peripheral blood leukocytes by inactivated bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v. 64, p. 4146–4151, 1990.

IBGE, 2019. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2015. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=9108&t=resultados>> Acesso em 20 de abril de 2019.

JUNQUEIRA, J.R.C.; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina, Ciências Agrárias**, v.27, p.471-480, 2006.

KOPPERS-LALIC, D.; RIJSEWIJK, F. A. M.; VERSCHUREN, S. B. E.; VAN GAANS-VAN, DEN BRINK, J. A.; NEISIG, A.; RESSENG, M. E.; NEEFJES, J.; WIERTZ, E. J. The UL41-encoded virion host shuttoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology**. 82, 2071–2081, 2001.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Ensaio Imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 343-346, 2000.

NASCIUTTI, N. R. Soroprevalência e fatores de risco associados ao herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarréia viral bovina em vacas leiteiras mestiças não vacinadas e *Neospora caninum* no município de Uberlândia. 2017. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2017.

NOORDEGRAAF, A. V.; JALVINGH, A.W.; JONG, M. C.; FRANKEN, P.; DIJKHUISEN, A. A. Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulation. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, p. 21–42, 2000.

OLIVEIRA, M. T.; CAMPOS, F. S.; DIAS, M. M.; VELHO, F. A.; FRENEAU, G. E.; BRITO, W. M.; RIJSEWIJK, F. A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v.75, p.1139-1145, 2011.

PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K.; ALENIUS, S.; CRANWELL, M. P.; PRITCHARD, G. C.; DREW, T. W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 142, p. 385–391, 1998.

PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; MAZZA, M. C. M.; LEITE, R. C. Doenças da reprodução e conservação genética: levantamento no núcleo de conservação do bovino pantaneiro. **EMBRAPA: Comunicado Técnico**, n.21, p.1-4, 1997.

PERRIM, B.; PERRIM, M.; MOUSSA, A. Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for a detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. **Veterinary Record**, v. 25, n. 138, p. 520, 1996.

RINALDI, L.; PACELLI, F.; IOVANE, G.; PAGNINI, U.; VENEZIANO, V.; FUSCO, G.; CRINGOLI, G. Survey of *Neospora caninum* and bovine herpes virus 1 coinfection in cattle. **Parasitology Research**, v. 100, p.359–364, 2007.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p.645-647, 2001.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, v.29, p.373-380, 1999.

ROLA, J. G.; LARSKA, M.; GRZESZUK, M.; ROLA, J. Association between antibody status to bovine herpesvirus 1 and quality of milk in dairy herds in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 781- 789, 2015. doi: 10.3168/jds.2014-8781, 2015.

SANTOS, M. R.; FERREIRA, H. C. C.; SANTOS, M. A.; SARAIVA, G. L.; TAFURI, N. F.; SANTOS, G. M.; TOBIAS, F. L.; MOREIRA, M. A. S.; ALMEIDA, M. R.; SILVA JÚNIOR, A. Antibodies against Bovine herpesvirus 1 in dairy herds in the state of Espírito Santo, Brasil. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 280-283, 2014.

SAYERS, R. G. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1340–1352, 2017.

SIEGLER, H. H.; MARSCHANG, F.; MORSCHER, H. Beobachtungen über Zusammenhänge zwischen Virus infectionen und boviner Mastitis. **Tierarztl Umschau**. v. 39, p. 602–604, 1984.

STAHL, K.; RIVERA, H.; VAGSHOLM, I.; MORENO-LOPEZ, J. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p. 193–202, 2002.

STATHAM, J. M.; RANDALL, L. V.; ARCHER, S. C. Reduction in daily milk yield associated with subclinical bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Record**, v. 177, p. 339, 2015.

STRAUB, O.C. Advances in BHV1 (IBR) research. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 108, p.419–422, 2001.

VAN Der ENGELENBURG, F. A. C.; MAES, R. K.; VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A. M. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.3129-3135, 1993.

VÁSQUEZ, N. F. R.; ARGAIZ, D. V.; SILVA, J. A. F.; PINO, J. L.; GUTIÉRREZ, J. J. C.; ÁNGEL, M. E. O. Seroprevalence and risk factors of several bovine viral diseases in dairy farms of San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 11, n. 1, p. 15-25, 2016.

VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. L. Anticorpos para o herpes vírus bovino 1 (BHV1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n.2, p.131-137, 2003.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Boston: **Kluwer Academic Publishers**. p.1-72, 1989.

YAN, B. F.; CHAO, Y. J.; CHEN, Z.; TIAN, K. G.; WANG, C. B.; LIN, X. M.; CHEN, H. C.; GUO, A. Z. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 136–141, 2008.

### 4.3. CAPÍTULO 3 - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À DIARREIA VIRAL BOVINA

Seroprevalence and risk factors associated with Bovine Viral Diarrhea

#### 4.3.1. RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a soroprevalência da Diarreia Viral Bovina (BVD) nos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo (ES), a possível relação entre BVD e mastite e os fatores de risco associados à BVD. Foram utilizadas 854 vacas mestiças de aptidão leiteira provenientes de 69 propriedades localizadas nos 12 municípios que compõem a região, entre fevereiro a julho de 2015. Amostras de sangue da veia coccígea foram coletadas para a determinação da soroprevalência da BVD, avaliada por meio do teste de ELISA indireto. A detecção de mastite clínica foi determinada por meio do teste da caneca de fundo preto e a mastite subclínica foi diagnosticada através do California Mastite Teste. As variáveis avaliadas foram reutilização de agulhas descartáveis, tipo de ordenha, manejo reprodutivo, mortalidade de bezerros, presença de problemas reprodutivos, realização de teste de brucelose e nível de produção. Os resultados foram demonstrados por meio de análise descritiva e as associações entre as variáveis foram estimadas pelo Odds Ratio (OR) e intervalo de 95% de confiança. O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar a significância das associações ( $p < 0,05$ ). A prevalência média de BVD para a região foi de 26,46%, variando entre 7,89 a 45,33%. Houve associação positiva entre o vírus da BVD e a presença de mastite clínica ( $p < 0,05$ ; OR=2,37; IC=1,30-4,30). A ordenha mecânica ( $p < 0,05$ ; OR=3,39; IC=1,78-6,47) foi considerada fator de risco para a BVD. Animais sororreagentes para BVD apresentam maiores chances de desenvolver problemas reprodutivos ( $p < 0,05$ ; OR=1,82; IC=1,34-2,48) e menores de mortalidade de bezerros ( $p < 0,05$ ; OR=0,41; IC=0,18-0,93). O manejo reprodutivo (inseminação artificial ou monta natural), reutilização de agulhas descartáveis, teste de brucelose e nível de produção não apresentaram associação com a BVD. Conclui-se que a BVD encontra-se disseminada nos rebanhos de leite dos municípios da região do Caparaó Capixaba. A presença de BVD aumenta as chances do animal apresentar mastite clínica. A presença de problemas reprodutivos e a ordenha mecânica foram

considerados fatores associados à infecção pelo vírus da BVD. Não houve relação entre a BVD e inseminação artificial, monta natural, reutilização de agulhas descartáveis, teste de brucelose e nível de produção.

**Palavras-chave:** BVD, ELISA indireto, mastite, vacas mestiças.

#### 4.3.2. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the seroprevalence of Bovine Viral Diarrhea (BVD) in the municipalities of Caparaó, Espírito Santo (ES), the possible relationship between BVD and mastitis and the risk factors associated with BVD. A total of 854 crossbred dairy cows from 69 farms located in the 12 municipalities that make up the region were used between February and July 2015. Blood samples from the coccygeal vein were collected for the determination of BVD seroprevalence, determined by ELISA. indirect. Detection of clinical mastitis was determined by the black bottom mug test and subclinical mastitis was diagnosed by the California Mastitis Test. The variables evaluated were reuse of disposable needles, type of milking, reproductive management, calf mortality, presence of reproductive problems, brucellosis test and production level. Results were demonstrated by descriptive analysis and associations between variables were estimated by Odds Ratio (OR) and 95% confidence interval. The chi-square test was used to verify the significance of the associations ( $p < 0.05$ ). The average prevalence of BVD for the region was 26.46%, ranging from 7.89 to 45.33%. There was a positive association between BVD virus and the presence of clinical mastitis ( $p < 0.05$ ; OR = 2.37; CI = 1.30-4.30). Mechanical milking ( $p < 0.05$ ; OR = 3.39; CI = 1.78-6.47) was considered a risk factor for BVD. Animals seroreactive for BVD are more likely to develop reproductive problems ( $p < 0.05$ ; OR = 1.82; CI = 1.34-2.48) and lower calf mortality ( $p < 0.05$ ; OR = 0.41; CI = 0.18-0.93). Reproductive management (artificial insemination or natural breeding), reuse of disposable needles, brucellosis test and production level were not associated with BVD. In conclusion, BVD is widespread in the dairy herds of the municipalities of Caparaó Espírito Santo's region. The presence of BVD increases the chances of the animal presenting clinical mastitis. Reproductive problems and mechanical milking were considered factors associated with BVD virus infection. There was no relationship between BVD and artificial insemination, natural mounts, reuse of disposable needles, brucellosis test and production level.

**Keywords:** BVD, crossbred cows, indirect ELISA, mastitis.

### 4.3.3. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um agente infeccioso presente em populações de bovinos em todo o mundo e causa perdas econômicas significativas devido a diminuição do desempenho e da produção de leite, distúrbios reprodutivos e aumento do risco de morbidade e mortalidade (WERNICKI et al., 2015). O desconhecimento da enfermidade, o alto potencial de transmissão e a falta de tratamento tornam a enfermidade mais preocupante, em 2013 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa número 50 (IN 50/2013), tornou a Diarreia Viral Bovina (BVD) uma doença de notificação ao serviço veterinário oficial de qualquer caso confirmado (MAPA, 2013).

O BVDV possui grande variedade antigênica sendo classificado em dois grupos antigênicos distintos BVDV-1 e BVDV-2. Os vírus do genótipo BVDV-1 compreendem em sua maioria as cepas vacinais e de referência e são responsáveis por infecções brandas a moderadas. O BVDV-2 foi identificado em surtos de infecção aguda e doença hemorrágica no Canadá, no entanto também foram isolados estirpes de virulência baixa a moderada. O BVDV pode ser classificado ainda em dois biotipos, o citopatogênico (CP) e o não citopatogênico (NCP), tal classificação é de acordo com o efeito da replicação do vírus em cultivo celular (RADOSTITS et al., 2007; FLORES et al., 2005).

Infecções pelo BVDV podem produzir sintomatologia variada de acordo com o biotipo viral envolvido e imunidade do animal. Os sinais clínicos mais evidentes são febre, descargas oculares e nasais, salivação, diarreia e presença de erosões e úlceras orais. Manifestações agudas estão relacionadas com a Doença das Mucosas (DM), uma rara apresentação da infecção que quase sempre é fatal. Nos machos o BVDV está relacionado com a diminuição da qualidade do sêmen, em fêmeas baixas taxas de fertilização, absorção embrionária, abortos e nascimento de bezerros fracos (FLORES, 2007; RADOSTITS et al., 2007; GROOMS, 2004; POTGIETER, 2004).

O BVDV pode causar depressão no sistema imunológico do hospedeiro predispondo o animal a infecções secundárias. Neste contexto, quadros clínicos de

BVD estão associados a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), pasteurelose e salmonelose (RADOSTITS et al., 2007; BROWNLIE, 2002). A taxa de mortalidade pode chegar a 8%, e a morbidade de 90% é facilmente encontrada (POTGIETER, 2004).

A infecção de uma fêmea gestante entre 40 e 120 dias de gestação dá origem a bezerros persistentemente infectados (PI), esses animais não formam anticorpos contra o BVDV e são classificados equivocadamente como soronegativos, apesar de eliminarem o vírus continuamente. A formação de bezerros PI acontece porque no referido período há formação do sistema imunológico do animal, que é concluído aos 125 dias de gestação aproximadamente, nesta fase proteínas virais são incorporadas erroneamente como próprias do organismo em formação, e o sistema imune do hospedeiro não forma anticorpos contra o BVDV. Entre 2 a 5% dos animais positivos para BVD são PI (FLORES et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007; POTGIETER, 2004).

A Diarreia Viral Bovina possui distribuição mundial, estima-se que a soroprevalência varia de 50 a 90% (KRAMPS et al., 1999). No Brasil, vários estudos sorológicos demonstram a ampla distribuição e a alta taxa de prevalência em diversos estados: Bahia 56% (NORONHA et al., 2001), Goiás 54,1% (BRITO, 2002), Minas Gerais 61% (MINEO et al., 2006), São Paulo 78% (RICHTZEINHAIN, 1997), Paraná 61,5% (ALFIERI et al., 2004) e Rio Grande do Sul 58,8% (SCHERER et al., 2002). Até o presente momento não há levantamento sorológico sobre a prevalência da BVD no estado do Espírito Santo.

As perdas relacionadas à produção incluem redução da produção de leite, redução da taxa de concepção, distúrbios respiratórios e gastrintestinais e morte dos animais. Neste contexto, na Dinamarca considerando incidência de 34% para BVDV foram estimadas perdas anuais de US\$ 57 milhões (HOUE, 1999), no Reino Unido as perdas anuais devido à infecção pelo BVDV foram calculadas em torno de US\$ 27 milhões (BENNETT, et al., 1999). Estimam-se perdas entre US\$ 40 e US\$ 95 por vaca infectada dentro do rebanho (HOUE, 2003) e redução de até € 19 por mil litros de leite produzido (FOURICHON et al., 2005).

O isolamento viral é o teste diagnóstico recomendado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2018), no entanto métodos diagnósticos como o ELISA estão ganhando importância, por apresentarem alta sensibilidade, rapidez na realização do exame, permite a avaliação de grande quantidade de amostras com menor custo, sendo utilizados com eficiência na rotina (RADOSTITS et al., 2007).

Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a soroprevalência da Diarreia Viral Bovina nos municípios da região do Caparaó, Espírito Santo, a possível relação entre BVD e mastite e os fatores de risco associados à Diarreia Viral Bovina.

#### 4.3.4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso em Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o número de protocolo 003/2015 e CEUA UFES Alegre sob o número de protocolo 008/2018.

Foram utilizadas 854 vacas mestiças (*Bos tauros tauros x Bos taurus indicus*) de aptidão leiteira, clinicamente saudáveis, em diferentes fases de lactação provenientes de propriedades localizadas nos 12 municípios que compõem a Microrregião do Caparaó Capixaba (20° 26' 5" S e 41° 47' 2" O), no Sul do Espírito Santo (Alegre, Bom Jesus do Norte, Divino de São Lourenço, Dores do Rio Preto, Guaçuí, Ibatiba, Ibitirama, Irupi, Lúna, Jerônimo Monteiro, Muniz Freire e São José do Calçado), no período de fevereiro a julho de 2015. No total foram avaliadas ao acaso 69 propriedades, sendo cinco propriedades avaliadas por município, com exceção de Alegre com nove e Jerônimo Monteiro, onde dez propriedades foram avaliadas.

Amostras de sangue total foram coletadas de todas as vacas em lactação por meio de punção da veia coccígea média em sistema de coleta a vácuo. O sangue colhido foi acondicionado em tubos sem anticoagulante e transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório de Produção Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo. Após colheita, as amostras foram centrifugadas a 200 G durante 5 minutos para a obtenção do soro, o qual foi fracionado em tubos de polietileno de 1,5 mL e armazenados a menos 80 °C. O

exame diagnóstico da Diarreia Viral Bovina foi realizado através do teste de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto) utilizando kit CIVTEST® BOVIS BVD/BD P80 (Amer, Catalunha, Espanha), segundo as recomendações do fabricante.

A detecção de mastite clínica foi determinada por meio da identificação dos sinais clínicos de inflamação da glândula mamária e pelo teste da caneca de fundo preto. A mastite subclínica foi diagnosticada por meio do California Mastite Teste (CMT). O animal foi considerado positivo para mastite clínica ou subclínica quando houve alteração ao teste da caneca ou CMT respectivamente, em pelo menos um teto.

As variáveis analisadas foram a prevalência de BVD, a possível relação entre BVD e mastite, bem como o questionário referente à reutilização de agulhas descartáveis (sim/não), fazia teste para brucelose (sim/não), tipo de ordenha (manual/mecânica), manejo reprodutivo (inseminação artificial/monta natural), mortalidade de bezerros alta (sim/não) e se a propriedade apresentava problemas reprodutivos (sim/não). As propriedades foram classificadas em pequenas, médias e grandes produtoras de leite com respectivas produções de até 53 litros, de 54 a 133 e acima de 133 litros de leite por dia (BARROS et al., 2001).

O cálculo do número amostral foi realizado de acordo com a fórmula abaixo:

$$n = deff \times \frac{Npq}{\frac{d^2}{1.96^2} (n - 1) + pq}$$

Onde:

$n$  = tamanho da amostra;

$deff$  = efeito do design;

$N$  = tamanho da população;

$p$  = proporção estimada;

$q = 1 - p$ ;

$d$  = nível de precisão absoluto.

Utilizando frequência antecipada de 50% para BVD, limite de confiança de 5%, intervalo de confiança de 99% e efetivo bovino do estado do Espírito Santo de 2.223.531 cabeças de gado no ano do estudo (IBGE, 2019), o número mínimo para o tamanho amostral calculado foi de 664 animais. Portanto, o tamanho amostral do presente estudo de 854 animais proporciona representatividade estatística.

Os resultados estatísticos foram demonstrados por meio de análise descritiva e as associações entre as variáveis foram estimadas pela razão dos produtos cruzados - Odds Ratio (OR) e intervalo de 95% de confiança. O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar a significância das associações ( $p < 0,05$ ). Os cálculos foram realizados no programa OpenEpi 3.01 (DEAN, SULLIVAN, SOE, 2013).

#### 4.3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está descrita a prevalência para Diarreia Viral Bovina (BVD) nos municípios que compõem a região do Caparaó, estado do Espírito Santo (ES). Como pode ser observado, na região estudada foi encontrada prevalência média de 26,46% (226/854) para BVD.

Houve grande variação na prevalência de BVD (7,89 a 45,33%) nos municípios estudados do Espírito Santo. Variação na prevalência de BVD (35,0 a 71,3%) em diferentes distritos da Argentina para bovinos acima de dois anos, utilizando o ELISA indireto como teste diagnóstico também foram relatadas (ÓDEON et al., 2001).

Tabela 1: Soroprevalência de Diarreia Viral Bovina (BVD) pelo teste de ELISA indireto em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

<b>Município</b>	<b>Animais reagentes</b>	<b>Animais não reagentes</b>	<b>Total</b>	<b>Prevalência de BVD (%)</b>
Bom Jesus do Norte	3	35	38	<b>7,89</b>
Dores do Rio Preto	8	76	84	<b>9,52</b>
Ibitirama	7	65	72	<b>9,72</b>
Iúna	9	60	69	<b>13,04</b>
Ibatiba	10	47	57	<b>17,54</b>
São José do Calçado	8	37	45	<b>17,77</b>
Irupi	7	28	35	<b>20,00</b>
Divino de São Lourenço	17	46	63	<b>26,98</b>
Guaçuí	10	26	36	<b>27,77</b>

Jerônimo Monteiro	55	82	137	<b>40,14</b>
Alegre	58	85	143	<b>40,55</b>
Muniz Freire	34	41	75	<b>45,33</b>
<b>Total</b>	<b>226</b>	<b>628</b>	<b>854</b>	<b>26,46</b>

Soroprevalência maior ao do presente estudo foi relatada em vacas na Paraíba 44,1% (MARQUES et al., 2016), 57,7% no Rio Grande do Sul (FRANDOLOSO et al., 2008), 65,66% no Maranhão (CHAVES et al., 2012), 64% em Goiás (BRITO et al., 2010) e 66,87% em bovinos de corte no Maranhão (BEZERRA et al., 2019).

No Brasil, não há programa oficial para o controle da BVD, e a alta prevalência da infecção em rebanhos leiteiros no Espírito Santo, juntamente com as perdas econômicas causadas pela infecção viral, demonstram a necessidade de ações de prevenção que contribuam para a redução da exposição à enfermidade.

Pode-se observar na Tabela 2, que existe associação significativa entre Diarreia Viral Bovina e a presença de mastite clínica. Neste contexto, animais sororreagentes para BVD aumentaram as chances em até 2,3 vezes de serem positivos para mastite clínica. Entretanto, não houve associação entre BVD e a presença de mastite subclínica.

Tabela 2: Associação entre Diarreia Viral Bovina e a presença de mastite clínica e mastite subclínica em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

	<b>Odds Ratio</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>Valor de p</b>
Mastite Clínica	2,37	1,30 - 4,30	0,003587*
Mastite Subclínica	1,14	0,84 - 1,55	0,3848

Valor de p obtido pelo teste de Qui-quadrado; \*Apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Corroborando ao presente trabalho, também foi encontrada correlação ( $p < 0,05$ ,  $OR = 1,8$ ;  $IC = 1,1 - 2,8$ ) entre BVD e a presença de mastite (NISKANEN et al., 1995). A associação positiva entre o vírus da Diarreia Viral Bovina e mastite, foi relatada com base nos títulos de anticorpos para BVDV em leite, no qual o número de casos de mastite aumentou em rebanhos com título aumentado de anticorpos para BVDV no leite. Aumento de 7% na taxa de mastite clínica em rebanhos expostos ao BVDV em comparação com os rebanhos não expostos foi relatado (WAAGE, 2000). Em outro

estudo, redução de até 10% na produção de leite foi observada em vacas com anticorpos contra o BVDV em comparação com vacas negativas para o vírus, no entanto os autores não relataram a presença de mastite (MOERMAN et al., 1994).

Estudos demonstram que o BVDV pode causar imunossupressão, sobretudo em animais persistentemente infectados. Neste contexto, o vírus da BVD pode desempenhar papel indireto na susceptibilidade do animal a infecções secundárias, ou pode aumentar a possibilidade de infecções secundárias gerarem um curso mais grave da enfermidade (POTGIETER et al., 1984). Estudos sobre o papel imunossupressor do BVDV em relação à mastite bovina são escassos. Há relatos de aumento da quantidade de casos de mastite em rebanhos soropositivos para BVDV, no entanto o papel desempenhado pelo BVDV nestes casos de mastite não é claro (SIEGLER et al., 1984).

Contudo, há falta de conhecimento em relação ao impacto real do vírus na saúde do úbere de vacas, não existindo evidências suficientes para incluir ou não os efeitos dos vírus em relação à mastite. No entanto, deve-se avaliar o possível impacto dos vírus no desenvolvimento da mastite, desta forma é importante considerar as ações para diagnosticar e controlar as doenças virais para que se possa ter um rebanho livre de enfermidades infectocontagiosas e aumentar a lucratividade no sistema de produção.

Na Tabela 3 está a distribuição percentual dos possíveis fatores de risco associados à soroprevalência da Diarreia Viral Bovina em vacas leiteiras mestiças na região do Caparaó, Espírito Santo.

Tabela 3: Distribuição percentual das possíveis variáveis associadas à soroprevalência de Diarreia Viral Bovina (BVD) em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

Variáveis	Animais testados	Animais sororreagentes à BVD	Prevalência BVD (%)
Nível de produção			
<b>Pequeno</b> (até 53 L)	41	10	<b>24,39</b>
<b>Médio</b> (de 54 a 133 L)	167	35	<b>20,95</b>
<b>Grande</b> (acima de 133 L)	646	181	<b>28,01</b>
Reutilização de agulha descartável			
<b>Sim</b>	467	123	<b>26,33</b>

<b>Não</b>	387	103	<b>26,61</b>
Mortalidade bezerros alta			
<b>Sim</b>	52	7	<b>13,46</b>
<b>Não</b>	802	219	<b>27,30</b>
Problemas reprodutivos			
<b>Sim</b>	401	131	<b>32,66</b>
<b>Não</b>	453	95	<b>20,97</b>
Faz teste de brucelose			
<b>Sim</b>	432	103	<b>23,84</b>
<b>Não</b>	422	123	<b>29,14</b>
Tipo de ordenha			
<b>Mecânica</b>	750	215	<b>28,66</b>
<b>Manual</b>	104	11	<b>10,57</b>
Manejo reprodutivo			
<b>Inseminação artificial</b>	521	128	<b>24,56</b>
<b>Monta natural</b>	333	98	<b>29,42</b>

Na Tabela 4 estão descritos os fatores associados à Diarreia Viral Bovina encontrados no presente trabalho. Como pode ser observado a presença de BVD aumenta as chances de problemas reprodutivos, e diminui a mortalidade de bezerros. A ordenha mecânica foi considerada fator que aumenta o risco associado à BVD ( $p < 0,05$ ). A monta natural, reutilização de agulhas descartáveis, teste de brucelose e nível de produção não apresentaram significância estatística ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4: Variáveis associadas à soroprevalência de Diarreia Viral Bovina (BVD) em vacas de leite mestiças nos municípios que compõem a região do Caparaó, Espírito Santo (fevereiro a julho de 2015)

	<b>Odds Ratio</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Problemas Reprodutivos</b>	1,82	1,34 - 2,48	0,0001101*
<b>Ordenha Mecânica</b>	3,39	1,78 - 6,47	0,00008892*
<b>Mortalidade de Bezerros</b>	0,41	0,18 - 0,93	0,02829*
<b>Monta Natural</b>	1,28	0,94 - 1,74	0,1163
<b>Reutilização de agulha descartável</b>	0,98	0,72 - 1,33	0,9273
<b>Teste de Brucelose</b>	0,76	0,56 - 1,03	0,07896
<b>Nível produção (Pequeno)</b>	0,89	0,42 - 1,84	0,7577
<b>Nível produção (Médio)</b>	0,68	0,45 - 1,03	0,07215
<b>Nível produção (Grande)</b>	1,41	0,97 - 2,04	0,06950

Valor de p obtido pelo teste de Qui-quadrado; \*Apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Das 69 propriedades avaliadas, 31 (44,92%) afirmaram haver problemas reprodutivos sendo o aborto (15), repetição de estro (8), retenção de placenta (4) e

infecção uterina (4) os mais citados, visto que alguns proprietários relataram mais de um problema reprodutivo. A presença de BVD foi considerada fator que aumenta o risco para problemas reprodutivos, segundo relato dos proprietários, ou seja, em propriedades com animais sororreagentes para BVD existe a chance 1,8 vezes maior de se encontrar problemas reprodutivos. Associação entre repetição de estro e o BVDV foi relatada por outros autores (TADESSE, DENEKE, DERESA, 2019). Neste contexto, também foi encontrada associação entre a ocorrência de aborto e a BVD, mas os autores não puderam afirmar se havia fator de risco associado pois o intervalo de confiança variou de 0,88 a 1,22 (BRITO et al., 2010). Diferente do presente trabalho, não foi encontrada associação entre a presença de problemas reprodutivos (aborto) e o BVDV, porém foi relatado pelos autores prevalência maior de BVD em propriedades onde ocorreu aborto ou problemas reprodutivos (BEZERRA et al., 2019; MARQUES et al., 2016; CHAVES et al., 2012).

No presente estudo, a ordenha mecânica foi considerada um fator de risco para a BVD, tendo os animais provenientes desse tipo de manejo apresentado risco de infecção para BVD 3,3 vezes maior que os animais que eram ordenhados manualmente. Corroborando ao presente trabalho, resultado semelhante foi relatado em Minas Gerais (NASCIUTTI, 2017). As deficiências no manejo, a sanidade do úbere e a desinfecção e manutenção inadequada dos equipamentos de ordenha mecânica podem ser considerados como fatores que auxiliam na transmissão de doenças infectocontagiosas.

Diferente do que era esperado, houve associação protetora entre BVD e mortalidade de bezerros (Tabela 4), ou seja, animais sororreagentes para BVD apresentaram menores chances de resultar em mortalidade de bezerros. Poucas propriedades relataram que a mortalidade de bezerros era alta (6/69) o que representa 6,08% dos animais avaliados (52/854), podendo ser esse o fator considerado para a não associação de risco com a enfermidade. Há relatos de associação entre mortalidade de bezerros maior que 5% e o BVDV, mas os autores alertam que este parâmetro não deve ser identificado como um fator de risco, mas sim consequência da infecção, que também poderia estar associado ao manejo inadequado do neonato (MARQUES et al., 2016).

Não houve associação do manejo reprodutivo por monta natural (MN) em relação à BVD (Tabela 4). Resultado semelhante foi encontrado por outros autores (TADESSE, DENEKE, DERESA, 2019). Diferente do presente trabalho, foi relatada associação entre MN e a BVD, sendo o touro utilizado para a reprodução considerado um fator que aumenta os riscos para a enfermidade, os autores relataram também que o uso da inseminação artificial pode ser considerado uma forma de controle da infecção (CHAVES et al., 2012). No entanto, a possível contaminação e disseminação do BVDV em técnicas de reprodução assistida como sêmen utilizado na IA e transferência de embriões pode acontecer (GARD, GIVENS, STRINGFELLOW, 2007).

A reutilização de agulhas descartáveis não foi considerada como fator de risco para a BVD (Tabela 4). Esperava-se que tal prática apresentasse associação com BVD, uma vez que há relatos na literatura que tal procedimento está associado com outras enfermidades infectocontagiosas como a Leucose Enzoótica Bovina (VÁSQUEZ et al., 2016). Pode-se perceber que em propriedades que realizam o teste de brucelose, houve menor prevalência de BVD (Tabela 3), mas não houve associação entre a realização da prática, ou não, em relação ao BVDV. No presente trabalho não foi encontrada associação entre o nível de produção e a presença de BVD.

Ações como diagnóstico, prevenção e redução da exposição do rebanho às enfermidades infectocontagiosas, contribuem para que o sistema imunológico funcione adequadamente, minimizando desta forma as perdas econômicas no sistema de produção. Contudo, vários fatores interferem na eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos, sobretudo a ocorrência de doenças infectocontagiosas no rebanho. É preciso alertar os produtores rurais por meio de informações sobre o controle das enfermidades, gerando assim maior rentabilidade de suas produções e qualidade dos produtos produzidos.

#### 4.3.6. CONCLUSÃO

Diante dos dados encontrados conclui-se que o vírus da Diarreia Viral Bovina encontra-se disseminado nos rebanhos bovinos leiteiros dos municípios que compreendem a região do Caparaó, Espírito Santo. Constatou-se que a presença de Diarreia Viral Bovina aumenta as chances do animal apresentar mastite clínica. Animais sororreagentes para BVD apresentaram maiores chances de desenvolverem problemas reprodutivos e menores de mortalidade de bezerros. O uso de ordenhadeira mecânica foi considerado fator que aumenta o risco associado à Diarreia Viral Bovina. Não foram encontradas relações entre o BVDV e monta natural, reutilização de agulhas descartáveis, teste de brucelose e nível de produção.

#### 4.3.7. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro, a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo desenvolvimento da pesquisa e oportunidade. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### 4.3.8. REFERÊNCIAS

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BARREIROS, M. A. B.; LEITE, J. P. G.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 99, p. 167-173,2000.

BARROS, G. S. A. C.; GALAN, V. B.; GUIMARÃES, V. A.; BACCHI, M.R.P. **Sistema agroindustrial do leite no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 172p, 2001.

BENNETT, R. M.; CHRISTIANSEN, K.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 455-459, 1999.

BEZERRA, N. P. C.; BEZERRA, D. C.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M.; SILVA, A. L. A. Risk factors analysis applied to antibodies to Bovine Herpesvirus Type 1, Bovine Viral Diarrhea Virus, Bovine Leukemia Virus and *Brucella abortus* among cattle: a cross-sectional study. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 13, n. 1, p. 5-12, 2019.

BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHAS-SON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Serological study on bovine viral diarrhoea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. **Vírus Reviews & Research**, v. 7, n. 1, p. 144, 2002.

BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Prevalência da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 7-19, 2010.

BROWNLIE, J. Bovine virus diarrhoea virus: pathogenesis and control. Proc. XXII **World Buiatrics Congress.**, Hannover, p.24-30, 2002.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina em bovinos leiteiros não vacinados no estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 495-502, 2012.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, 2013. Disponível em: [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com), Acessado em 10/04/2019.

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

FLORES E.F. **Virologia Veterinária**. Ed. UFMS, Santa Maria, p.435-462, 2007.

FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F.; BAREILLE, N.; SEEGER, H. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, p.177-181, 2005.

FRANDOLOSO, R.; KREUTZ, L. C.; ANZILEIRO, D.; SPAGNOLO, J.; KUSE, N.; FIORI, C.; BARCELLOS, L. J. G.; SCORTEGAGNA, G. T. Prevalência de Leucose

Enzoótica Bovina, Diarréia Viral Bovina, Rinotraqueíte Infeciosa Bovina e Neosporose Bovina em 26 propriedades leiteiras da região Nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n. 4, p.1102-1106, 2008.

GARD, J. A.; GIVENS, M. D.; STRINGFELLOW, D. A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 434-442, 2007.

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

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v.31, n.2, p. 137-143, 2003.

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

IBGE, 2019. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2015. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=9108&t=resultados>> Acesso em 20 de abril de 2019.

KRAMPS, J. A.; VAN MAANEN, C.; VAN DE WETERING, G.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 135-144, 1999.

MARQUES, A. L. A.; ASSIS, A. C. O.; SIMÕES, S. V. D.; TOLENTINO, M. L. D. L.; AZEVEDO, S. S. Risk factors associated with Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) infection in the semiarid of the state of Paraíba, in the northeast region of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3095-3106, 2016.

MINEO, T.W.P.; ALENIUS, S.; NASLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJORKMAN, C. Distribution of antibodies against Neospora caninum, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.15, p.188-192, 2006.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 50, de 24 de Setembro de 2013. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-sisa/Listadoencomasanimaisdenotificaoobrigatoria.pdf>. Acesso: 12 de Maio de 2019.

MOERMAN, A.; STRAVER, P. J.; DE JONG, M. C. M.; QUAK, J.; BAANVIGER, T.; VAN OIRSCHOT, J. T. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. **Veterinary Quarterly**, v. 16, p. 115–119, 1994.

NASCIUTTI, N. R. Soroprevalência e fatores de risco associados ao herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina em vacas leiteiras mestiças não vacinadas e *Neospora caninum* no município de Uberlândia. 2017. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2017.

NISKANEN, R.; EMANUELSON, U.; SUNDBERG, J.; LARSSON, B.; ALENIUS, S. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 23, p. 229–237, 1995.

NORONHA R.; CAMPOS, S.G.; SARDI, S. Serum neutralization test and viral isolation for bovine viral diarrhoea virus in the state of Bahia. **Virus Reviews & Research**, v.6, p.146, 2001.

ODEÓN, A. C.; SPATH, E. J. A.; PALOMA, E. J.; LEUNDA, M. R.; SAINS, I. F.; PEREZ, S. E.; KAISER, G. G.; DRAGHI, M. G.; CETRA, B. M.; CANO, A. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratório en Argentina. **Revue Médecine Veterinaire**, v. 82, p. 216-220, 2001.

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2018. Organização Mundial de Saúde Animal. (Disponível em:<<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>). Acesso em: 05 mai 2019.

POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease, p.946-969. In: Coetzer J.A.W., Thomsom N.G.R. & Tustin R.C. (Eds), **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed., Oxford University Press, Cape Town, 2004.

POTGIETER, L. N. D.; MCCRACKEN, M. D.; HOPKINS, F. M.; WALKER, R. D.; GUY, J. S. Experimental production of bovine respiratory tract disease with viral diarrhoea virus. **American Journal Veterinary Research**, v. 45, p. 1582–1585, 1984.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K.W. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed., Saunders-Elsevier, Edinburgh, 2007. 2156 p.

RICHTZENHAIN, L. J. Em busca de respostas. **Revistata Criadores**, v.40, p.808, 1997.

SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; DURR, J. W.; BRUM, L. P.; QUADROS, V. L.; LIMA, M. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p. 45-50, 2002.

SIEGLER, H. H.; MARSCHANG, F.; MORSCHER, H. Beobachtungen uber Zusammenhange zwischen Virus infectionen und boviner Mastitis. **Tierarztl Umschau**. v. 39, p. 602–604, 1984.

TADESSE, T.; DENEKE, Y.; DERESA, B. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus and its potential risk factors in dairy cattle of jimma town, southwestern Ethiopia. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 8, p. 11-17, 2019.

VÁSQUEZ, N. F. R.; ARGAIZ, D. V.; SILVA, J. A. F.; PINO, J. L.; GUTIÉRREZ, J. J. C.; ÁNGEL, M. E. O. Seroprevalence and risk factors of several bovine viral diseases in daiey farms of San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 11, n.1, p.15-25, 2016.

WAAGE, S., Influence of new infection with bovine virus diarrhoea virus on udder health in Norwegian dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.20, p. 123–135, 2000.

WERNICKI, A.; URBAN, R.; STEGIERSKA, D.; ADASZEK, L.; KALINOWSKI, M.; PUCHALSKI, A.; DEC, M. Detection of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in young beef cattle in eastern and southeastern regions of Poland. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n.1, p.141–146, 2015.