

ADRIANA SOARES LEITE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BRUCELOSE, TUBERCULOSE,
DIARRÉIA VIRAL BOVINA E RINOTRAQUEÍTE
INFECCIOSA BOVINA EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*),
(LINNAEUS, 1758) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE
TAIPU - RIO GRANDE DO NORTE**

**RECIFE
2004**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ADRIANA SOARES LEITE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BRUCELOSE, TUBERCULOSE,
DIARRÉIA VIRAL BOVINA E RINOTRAQUEÍTE
INFECCIOSA BOVINA EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*),
(LINNAEUS, 1758) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE
TAIPU - RIO GRANDE DO NORTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco - UFRPE, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Co-Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE
2004

Catálogo na Fonte

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

C172a Leite, Adriana Soares
Associação entre brucelose, tuberculose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina em búfalos (*Bubalus bubalus*), (Linnaeus, 1758) provenientes do município de Taipu – Rio Grande do Norte / Adriana Soares Leite. – 2004. xxf. : il.

Orientador: Leucio Câmara Alves
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia e anexo.

CDD 636.089 44

1. Microbiologia veterinária
2. Bacteriose
3. Virose
4. Sanidade
5. Bubalino
6. Sorologia
7. Epidemiologia
8. Veterinária
9. Rio Grande do Norte (RN)
- I. Alves, Leucio Câmara
- II. Título

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BRUCELOSE, TUBERCULOSE,
DIARRÉIA VIRAL BOVINA E RINOTRAQUEÍTE
INFECCIOSA BOVINA EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*),
(LINNAEUS, 1758) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE
TAIPU - RIO GRANDE DO NORTE**

ADRIANA SOARES LEITE

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Jane Megid

Profa. Dra. Marta Pedrosa Souto Maior

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

Prof. Dr. Pierre Castro Soares

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

DEDICO

A meus pais, **Gastão Miguel Tavares Leite** e **Ana Maria Soares Leite**, que me ensinaram através de seu amor, trabalho e honestidade a não desistir de meus objetivos.

As minhas avós, **Maria José Tavares Leite** e **Oswaldina Martins Soares**, por todo amor e carinho que tenho tido o privilégio de desfrutar.

Ao meu marido, **Alexandre César Alves Silva**, por compreender minhas necessidades e me apoiar nos momentos difíceis.

As minhas filhas **Sarah Leite Ferreira dos Santos** e **Anna Camila Leite Alves Silva**, pelo amor incondicional que me inspira a seguir em frente, para lhes oferecer os bons frutos da vida.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pai todo poderoso, por ter me dado força de vontade para superar os obstáculos, determinação e principalmente saúde para conquistar os meus objetivos.

O meu profundo agradecimento ao Professor **Leucio Câmara Alves**, por ter me acolhido com respeito, carinho e amizade, além de orientar e transmitir com muita sabedoria os ensinamentos para minha vida profissional e pessoal. Sem seu apoio, não haveria este capítulo em minha vida.

Ao Professor Dr. **Rinaldo Aparecido Mota**, pela amizade, apoio e por ter se colocado à disposição para o processamento de amostras no Laboratório de Doenças Infecciosas da UFRPE, contribuindo com atenção e grandeza nesta pesquisa.

À Professora Dra. **Marta Pedrosa Souto Maior**, a quem muito admiro por sua competência profissional e amizade verdadeira, e pelo auxílio sempre disponível.

Ao Professor Dr. **Frederico Celso Lyra Maia** pelo carinho e presença.

Ao Professor Dr. **Pierre Castro Soares** pela grande ajuda, e pela colaboração dedicada.

Ao Professor Dr. **Leonildo Bento Galiza da Silva**, pela disponibilidade de informações que contribuirão para a minha vida profissional.

A **Cid Alencar, Mônica Amorim e Kelly Fagundes** pelo companheirismo e ajuda nos momentos difíceis, e aos colegas do LAPA-Recife pela compreensão.

A **Júnior** do Laboratório de Doenças Infecciosas da UFRPE, por estar disponível para ajudar.

Às secretárias da pós-graduação **Edna Izabel Chérias e Vera Moura** pela solicitude.

A todos os professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, o meu “**MUITO OBRIGADA**”.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO.....	i
SUMMARY.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ANEXOS.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 BUBALINOCULTURA.....	03
2.2 BRUCELOSE.....	04
2.3 TUBERCULOSE.....	07
2.4 DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVD).....	08
2.5 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR).....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 ANIMAIS.....	14
3.2 AREA ESTUDADA.....	14
3.3 OBTENÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	15
3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS LABORATORIAIS.....	15
3.5 PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	16
3.5.1 TESTE INTRADÉRMICO PARA TUBERCULOSE.....	16
3.5.2 SOROLOGIA PARA BRUCELOSE.....	18
3.5.3 SOROLOGIA PARA BVD E IBR.....	18
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 BRUCELOSE.....	21
4.2 TUBERCULOSE.....	27
4.3 DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVD).....	30
4.4 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR).....	31
5. CONCLUSÕES.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

Título: ASSOCIAÇÃO ENTRE BRUCELOSE, TUBERCULOSE, DIARRÉIA VIRAL BOVINA E RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) (LINNAEUS, 1758) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE TAIPU - RIO GRANDE DO NORTE.

Foi realizado um estudo epidemiológico para determinar a prevalência de anticorpos séricos anti-*Brucella abortus* e a associação com as infecções por *Mycobacterium bovis*, vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR (BHV-1). Foram analisadas 241 amostras séricas de bubalinos com aptidão leiteira no Município de Taipu – RN, empregando o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e as provas de soroglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-ME) para o diagnóstico da brucelose; prova de virusneutralização (VN) para detecção de anticorpos para BVD e IBR. Os animais foram também submetidos ao teste cervical comparativo para tuberculose. Os resultados mostraram 32,34% de amostras soropositivas para *B. abortus*, 24,07% de animais com reação positiva ao teste alérgico para Tuberculose, 76,76% de animais sororreagentes para BVDV e 49,79% para BHV – 1. Foi detectada associação entre animais reagentes e não reagentes aos testes para *B. abortus* e BHV – 1 ($p < 0,001$).

SUMMARY

Title: ASSOCIATION AMONG ANTIBODIES FOR BRUCELLOSIS, TUBERCULOSIS, BOVINE VIRUS DIARRHEA AND BOVINE INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS (IBR) IN WATER BUFFALOES (*Bubalus bubalis*) (LINNAEUS, 1758) FROM TAIPU CITY - RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL.

An epidemiological study was performed to evaluate the prevalence of serum antibody to *B. abortus*, BVDV, BHV – 1 and tuberculin sensitivity to *M. bovis*, and the association among these infections. Sera from 241 dairy buffaloes were analyzed by buffered plate antigen test (BPAT), serum agglutination test (SAT) and by 2-mercaptoethanol (2-ME) for the diagnosis of *Brucella abortus*, virusneutralization (VN) for BVDV and BHV – 1 and comparative cervical tuberculin test for *M. bovis*. The results showed 32,34% of positive samples to *B. abortus*, 24,07% of positive tuberculin reactors, 76,76% of reactive samples to BVDV and 49,79% to BHV – 1. Association was found between reagent and non reagent animals to the tests to *B. abortus* and BHV – 1 ($p < 0,001$).

LISTA DE TABELAS

	Página	
Tabela 1	Distribuição das frequências absoluta e relativa dos resultados aos testes empregados no diagnóstico de enfermidades bacterianas e virais em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004.....	21
Tabela 2	Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para Brucelose e Tuberculose em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004.....	25
Tabela 3	Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para Brucelose e BVD em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004.....	26
Tabela 4	Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para Brucelose e IBR em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004.....	27
Tabela 5	Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para Tuberculose e BVD em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004.....	29
Tabela 6	Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para Tuberculose e IBR em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004.....	30
Tabela 7	Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para BVD e IBR em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004.....	31

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 01 Mapa do Estado do Rio Grande do Norte.....	35
Anexo 02 Mapa da Mesorregião do Litoral Nordeste: Localização do Município de Taipu – RN.....	35
Anexo 03 Modelo de questionário investigativo.....	36

1. INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*), (Linnaeus, 1758) pertence à Ordem Artiodactyla, Subordem Ruminantia, família Bovidae, Subfamília Bovinae. É originário da Ásia, e foi levado inicialmente para a África, Europa, Oceania e posteriormente para as Américas. (ABCB - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS, 2003).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura - *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2004), o rebanho bubalino mundial é estimado em 164,3 milhões de cabeças, representando 11% do rebanho bovídeo mundial, apresentando uma taxa de crescimento de 10% ao ano em países em desenvolvimento, e mundialmente de 50%. A produção de leite desta espécie aumentou 200% nas duas últimas décadas.

Animal extremamente rústico, o búfalo sobrevive em ambientes muitas vezes inviáveis à criação de bovinos. Com incrível capacidade adaptativa, apresenta ampla distribuição geográfica, habitando desde regiões de baixíssima temperatura como a Rússia até regiões quentes e úmidas como por exemplo a Ilha de Marajó no Brasil. Também se destaca pela habilidade de transformar volumosos grosseiros em proteínas de alto valor biológico (CHAVES FILHO e TAVARES, 1992; SILVA et al., 1995). É ainda considerado pela FAO (2004) um dos mais pacíficos animais que servem ao homem.

Mundialmente o principal produto do búfalo é o leite, correspondendo a 10% de todo leite produzido no mundo. Na Índia, este chega a 60% do leite produzido no país (ABCB, 2003). A introdução do animal no Brasil se deu no século XIX, em torno de 1890, através da Ilha de Marajó – Pará, onde atualmente até a polícia montada utiliza búfalos (ABCB, 2003). O rebanho atual do país é de aproximadamente 2,5 milhões de cabeças, com cerca de 15% deste rebanho localizado na região Nordeste (FAO, 2004; ABCB, 2003).

No Brasil são criadas quatro raças. Três são de origem indiana: Carabao, mais encontrada na Região Norte; Murrah, com grande aptidão leiteira e por ser compacta e precoce tem crescido muito em número no Brasil; e Jafarabadi: a maior, sendo denominada pelo porte, rusticidade e eficiência de “o trator do Oriente”. Há também a Mediterrânea, de origem italiana, que sofreu grande seleção à produção leiteira na Europa (ABCB, 2003).

Uma das características expressivas dos búfalos é a produção de carne. No Brasil, o enfoque principal é este, mostrando sua dupla aptidão. Como durante muitos anos foram animais essencialmente de trabalho, sua musculatura foi muito desenvolvida, tornando o búfalo uma excelente alternativa para este fim. Em estudo realizado no Brasil foi observado que, em média, cerca de 40% de consumidores entrevistados já consumiram carne identificada como de búfalo (GAGLEAZZI et al., 2003).

Considerando a demanda por carne e leite de búfalos e a produtividade atual, a FAO (2004) prevê a contínua expansão desta cultura nos próximos anos.

Deve-se destacar, porém, que assim como os demais animais, para expressar toda sua potencialidade, o búfalo necessita de boas condições de manejo, nutrição e sanidade (ABCB, 2003). Ele é descrito como um animal cujo potencial é subutilizado, principalmente em regiões que convivem com grandes problemas sociais (COCKRILL, 1974).

Os aspectos sanitários da bubalinocultura até o presente momento não são amplamente estudados devido ao fato de que, por muito tempo, estes animais estarem em rebanhos isolados, sem grande número de cabeças, e pela crença popular de que o manejo dos búfalos não exigia técnicas próprias, ignorando as peculiaridades da espécie, como, por exemplo, o estresse nutricional, principalmente decorrente de carência mineral, notadamente de cálcio, e a maior susceptibilidade ao estresse térmico devido à pele grossa e

escura. Os búfalos eram ainda erradamente considerados imunes a várias doenças (LAU, 1999).

De acordo com o *Office International des Epizooties* - OIE (2003) vários patógenos importantes estão envolvidos em doenças de bubalinos, e entre as enfermidades infecto-contagiosas de origem bacteriana e viral destacam-se a brucelose, a tuberculose (TB), a diarreia viral bovina (BVD) e a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR).

Atualmente estas enfermidades apresentam-se amplamente distribuídas, destacando-se pela sua importância econômica, visto que participam como responsáveis pela queda na produtividade, apontadas por ocasionar prejuízos à pecuária, com perdas enormes devido às altas taxas de mortalidade, abortos, natimortos, gastroenterites, conjuntivites, encefalites, problemas respiratórios e afecções do trato genital (BROWLIE, 1990; MILLER, 1991). Há também o aspecto de zoonose, conferindo importância no contexto de saúde pública da brucelose e da tuberculose, que se constituem em risco ocupacional para magarefes, fazendeiros, trabalhadores rurais e médicos veterinários, além dos riscos aos consumidores (BRASIL, 2003).

O trânsito de animais e seus produtos pode favorecer a disseminação destas enfermidades, o que é normalmente agravado pelo caráter persistente das mesmas, que torna animais infectados fontes de contaminação para os susceptíveis. Há ainda as barreiras zoonitárias comerciais impostas (FRAULO e GALIERO, 1999), o que se constitui em um obstáculo no processo produtivo do agronegócio brasileiro.

Diante do exposto e devido ao potencial de crescimento da bubalinocultura na Região Nordeste, aliado à falta de relatos sobre estas enfermidades nos rebanhos bubalinos, idealizou-se necessária a realização deste estudo, cujo objetivo foi verificar a prevalência e

a associação entre brucelose, tuberculose, diarréia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina em bufalos provenientes do município de Taipu - Rio Grande do Norte, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brucelose

A brucelose é uma zoonose de distribuição e importância mundial pelo prejuízo causado à saúde animal, conferindo pesado tributo à pecuária (FEITOSA et al., 1991). Segundo Garcia-Carrilo (1984) é um dos mais sérios problemas sanitários em bubalinocultura nas Américas, impedindo inclusive sua expansão pela restrição de comércio devido a barreiras sanitárias citadas por Fraulo e Galiero (1999) na Itália. Causa igualmente problemas de saúde pública, sendo que o homem é infectado através do manejo dos animais ou pelo consumo de leite cru e derivados (POESTER e THIESSEN, 1994).

Vasconcellos et al. (1987) relatam que os índices mais altos de infecção ocorrem em gado leiteiro, especialmente nos rebanhos da América Latina e Ásia. O maior impacto econômico se dá portanto nos países em desenvolvimento, especialmente naqueles que não implementaram programas de erradicação (CORBEL, 1997).

No Brasil, a enfermidade foi introduzida no início do século XX, pela importação de gado europeu. A doença se disseminou mais rapidamente pelo hábito criado de comercializar animais reagentes (LANGENEGGER, 1992a).

Associada frequentemente a problemas reprodutivos afeta também os bubalinos (GUARINO et al., 2001; BRASIL, 2003). O agente etiológico é a bactéria do gênero *Brucella*, coco-bastonete Gram negativo que compreende seis espécies: *Brucella melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, com destaque à *Brucella abortus*, mais frequentemente isolada em búfalos (FRAULO e GALIERO, 1999).

A doença pode significar um problema latente, sem sintomas ou lesões, sendo a ocorrência de manifestações clínicas variáveis. Nas fêmeas das diversas espécies afetadas, o aborto no terço final da gestação é o sinal mais freqüente (NICOLETTI, 1980), podendo causar retenção de placenta, metrite, além da queda na produção leiteira. O feto abortado, líquidos, placenta e envoltórios fetais são as principais fontes de contágio. A transmissão ocorre por contato de animais sadios com restos contaminados, podendo ocorrer infecção por ingestão de produtos contaminados com materiais de partos ou abortos ou através de lesões teciduais. Os machos infectados podem transmitir a infecção às fêmeas pela monta natural (GUARINO et al., 2001) e a inseminação artificial também é incriminada. Determinados fatores como a gestação e desenvolvimento sexual podem tornar susceptíveis as fêmeas bovinas, visto que a imaturidade sexual constitui fator de resistência a *B. abortus*, devido à ausência do eritritol, álcool presente no organismo do animal adulto (LANGENEGGER, 1992a).

Em condições de campo a brucelose bubalina ocorre de modo semelhante à bovina (LAU, 1999), sendo ambas as espécies igualmente susceptíveis à enfermidade. Poester et al. (2002) admitiram que a prevalência é maior em locais onde a densidade dos rebanhos aumenta.

O controle eficiente e sobretudo a erradicação da brucelose se baseiam em um diagnóstico populacional seguro, através de provas sorológicas. Sem estes dados, torna-se inviável a prática de tais programas (MOLNAR et al., 2002).

No que se refere à freqüência da infecção, inquéritos realizados revelam uma grande variação na ocorrência da doença no mundo. Refai (2002), utilizando a soroaglutinação lenta em tubo (SAL), detectou 10,0% do rebanho bubalino reagente no Egito. Na Índia, através do emprego do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e

da soroaglutinação lenta em tubo (SAL) foi verificado por Isloor et al. (1998) média de 1,8% (129/7153) em granjas leiteiras em 23 Estados, aumentando este índice em propriedades organizadas ao sul do país com antecedentes de abortamentos, retenção de placenta e repetidas inseminações sem êxito. Em outro levantamento soroepidemiológico realizado em rebanhos bubalinos da Índia, Renukaradhya et al. (2002) reportaram média de 3,0% de sororreagentes, sendo que a região de Nova Delhi mostrou índice de 23,3% (7/30), também com as provas do AAT e SAL.

No Brasil a infecção tem sido reportada em vários Estados da Federação. Em São Paulo, Mathias e Pinto (1983) realizaram as provas do antígeno acidificado tamponado (AAT) e de fixação do complemento (FC), encontrando índices de 38,2% (81/212) e 46,7% (99/212) respectivamente. No mesmo Estado, Feitosa et al. (1991), observaram 24,0% (378/1573) de animais sororreagentes através da soroaglutinação lenta em tubo (SAL). Ainda no Estado de São Paulo, Fujii et al. (2001), através da utilização do mesmo teste, observaram 8,6% (19/122) de soropositivos.

Na região Centro Oeste do Brasil, Costa et al. (1973), no Estado de Goiás, encontraram 20,6% (41/199) de animais positivos ao teste de soroaglutinação rápida (SAR).

Com o emprego da SAL, Del'Rei et al. (2002) no Estado da Bahia, verificaram frequência de 8,7% (29/337) de animais reagentes ao teste.

No Norte do Brasil, onde se encontram os maiores plantéis de bubalinos, Munchow e Pizarz (1994) registraram 11,0% (112/1020) de positividade ao teste SAL no Estado do Amazonas. No Estado do Pará Lopes et al. (1999) observaram que 3,44% (1/29) dos animais estudados foram positivos ao teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) competitivo.

Molnar et al. (1998) também citam a alta prevalência de brucelose como sério problema de saúde animal em rebanhos bovinos e bubalinos na região Amazônica, e com o emprego do teste de ELISA competitivo Molnar et al. (2001b) examinaram 1181 amostras de soro bubalino de 37 rebanhos paraenses e encontraram uma média de 17,52% (207/1181) de positivos. Foi constatado que apenas três propriedades se encontravam livres da infecção, e a soropositividade variou de 1,70% a 78,84%.

2.2 Tuberculose

A tuberculose bovina e bubalina é uma zoonose de evolução crônica e distribuição mundial, sendo causada por *Mycobacterium bovis*, da família Micobacteriaceae. São bacilos curtos, aeróbios, imóveis, não capsulados, sendo a álcool-ácido-resistência sua propriedade característica (BRASIL, 2003).

O bacilo *M. bovis* é patogênico para várias espécies domésticas e silvestres, sendo os búfalos susceptíveis à cepa bovina, que se constitui na principal causa da tuberculose animal. A doença caracteriza-se pelo desenvolvimento progressivo de lesões granulomatosas que podem estar localizadas em qualquer órgão (BRASIL, 2003).

A tuberculose em um rebanho é introduzida principalmente por aquisição de animais infectados. A principal via de infecção é a respiratória. Uma vez nos alvéolos, os bacilos são fagocitados por macrófagos e seu destino depende da virulência do microrganismo, da carga infectante e da resistência do hospedeiro. A via digestiva ocorre principalmente em bezerros alimentados com leite de vacas com mamite tuberculosa ou ainda por água e forragens contaminadas (LANGENEGGER, 1992b).

Poucos são os levantamentos epidemiológicos sobre a frequência da infecção em bubalinos. Mohan (1968), descrevendo as doenças infecciosas e parasitárias de búfalos, relata frequência de 18,00% na Índia e 25,00% no Paquistão para *M. bovis*. No Egito, Selim et al. (1978) também realizaram o teste comparativo em 25 búfalos, e 17 (68,00%) foram reagentes.

Portugal et al. (1971) realizaram o teste cervical comparativo em 250 búfalos no Estado de São Paulo, e 16 (6,40%) apresentaram-se reagentes. Com o emprego da mesma técnica, Mota et al. (2002) no Município de Parintins, Amazonas, obtiveram 20,41% (266/1303) de reação positiva.

Um estudo sobre a tuberculose bovina em 1735 búfalos abatidos para consumo no Estado do Pará revelou que de 49 cepas micobacterianas 33 (67,3%) eram de *Mycobacterium bovis* (FREITAS, 1999).

2.3 Diarréia Viral Bovina (BVD)

A BVD é uma infecção que apresenta distribuição mundial (HOUE, 1995), causada por vírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, que inclui ainda os vírus da peste suína clássica (PSC) e doença da fronteira dos ovinos (Border Disease – BD), com os quais o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) está relacionado (DONIS, 1995). É um vírus RNA envelopado, apresentando duas cepas descritas: não-citopatogênica e citopatogênica (BROWNLIE, 1990).

A enfermidade foi descrita concomitantemente por Olafson et al. (1946) nos Estados Unidos e Childs (1946) no Canadá. A descrição do vírus como agente causal foi realizada por Pritchard et al. e Shipper et al. (1955). No Brasil, o vírus da BVD (BVDV) foi

isolado em 1974 por Vidor em abatedouros no Estado de São Paulo (LANGENEGGER, 1992c).

São susceptíveis bovídeos de todas as idades, e as infecções podem variar desde subclínicas com recuperação até a forma clínica grave com evolução para o óbito, como no caso da doença das Mucosas (DM), descrita por Ramsey e Chivers (1956).

A transmissão se dá principalmente por contato entre os animais, sendo as portas de entrada da infecção usualmente a orofaringe e o trato respiratório. Meios indiretos de infecção através de alimentos, urina, secreções oronasais, fezes, fetos abortados e placenta, também ocorrem (LANGENEGGER, 1992a).

A transmissão vertical tem papel importante na epidemiologia e patogenia da doença, e o BVDV é agente de distúrbios na reprodução bovina, relacionando-se com a diminuição da taxa de prenhez (WEIBLEN, 1991). Sendo infectivo para fêmeas susceptíveis, leva a infecções congênitas quando acomete vacas prenhes sorologicamente negativas (BROWNLIE, 1985; BROWLIE, 1990; MCGOWAN et al., 1993). Estas infecções podem resultar em morte fetal, aborto, mumificação ou malformação fetal e nascimento de bezerros inviáveis, sendo citado que a primoinfecção de fêmeas prenhes leva à infecção do feto em 100% dos casos (BAKER, 1995).

A enfermidade aguda se caracteriza por infecção primária na mucosa oronasal. Pode haver pequenas ulcerações de mucosa nasal, oral e esofageana (BAKER, 1987). A disseminação sistêmica pode ocorrer na forma livre no soro ou de vírus associado à capa flogística do sangue (TRUIT e SCHECHMEISTER, 1973). Podem ocorrer síndromes gastroentéricas ou respiratórias, com diarreia ou pneumonia transitória, ou ainda síndromes hemorrágicas, geralmente na forma de surtos (BAKER, 1995; CARMAN et al., 1998). Em alguns casos de infecção aguda também pode ocorrer agalaxia (PERDRIZET et al., 1987).

Infecções pelo BVDV assumem características mais graves quando concomitantes com outros agentes patogênicos, como o da rinotraqueíte infecciosa bovina, produzindo enfermidade mais severa do que na presença de um só agente (BROWNLIE, 1990). Tal fato parece estar ligado à imunossupressão devida a uma leucopenia transitória e conseqüente disfunção dos neutrófilos (ROTH et al., 1981). Touros podem sofrer uma depressão temporária de fertilidade, e eliminar transitoriamente vírus através do sêmen (PATON et al., 1989).

Podem surgir ainda animais persistentemente infectados (PI): bezerros saudáveis ao nascimento, filhos de vacas com primoinfecção entre aproximadamente 40 e 120 dias de gestação, são disseminadores da infecção, com papel relevante na epidemiologia da doença, pois são imunotolerantes à mesma e se tornam fontes contínuas de disseminação do BVDV (BROWNLIE, 1990; HORZINEK, 1990). Após 150 dias de gestação, o feto se torna imunocompetente e a infecção usualmente levará a uma resposta com produção de anticorpos e um bezerro normal virá a termo. Igualmente, em vacas sororreagentes, os anticorpos maternos protegem a infecção fetal, sendo as infecções congênicas e uterinas restritas a vacas sorologicamente negativas (BROWNLIE, 1990). Weiblen (1992) lembra que em rebanhos com a enfermidade, a maioria dos animais está imune. Se algum animal susceptível (negativo) ingressar no plantel, pode adquirir a doença e morrer.

Alguns animais virêmicos podem alcançar maturidade sexual e serem mantidos como reprodutores. Touros PI têm má qualidade, com fertilidade reduzida (KIRKLAND et al., 1994; REVELL et al., 1988). O sêmen também pode apresentar alterações (PATON et al., 1990). Bezerros de vacas infectadas muitas vezes são fracos ao nascerem e não se desenvolvem (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995).

A doença das mucosas (DM) ocorre quando animais persistentemente infectados mais tarde são infectados com a cepa citopatogênica homóloga (BROWNLIE, 1990). Também pode ocorrer por superinfecção (BOLIN, 1995; BROWNLIE et al., 1984), recombinação de biótipos não citopatogênicos ou mesmo mutação do biótipo persistente (LOEHR et al., 1998). A DM é invariavelmente fatal. Seu desenvolvimento pode ser tão rápido que os primeiros sinais percebidos podem ser a presença de animais moribundos ou mortos. Outras vezes, podem ocorrer anorexia, relutância a locomover-se, dor abdominal, diarreia profusa e erosões na mucosa oral, com salivação e lacrimejamento excessivos. A presença e a intensidade desses sintomas podem variar segundo as formas aguda, subaguda e crônica da doença (BUCKNER e GRUNDER, 1995).

Estudos sorológicos são empregados para verificação do estado sanitário de rebanhos; testes pontuais podem ser realizados em triagem inicial, como parte de programa para o controle e erradicação da BVD (LINDBERG e ALENIUS, 1999). No Egito, Zaghawa et al. (1998) registraram a prevalência de 52,0% em rebanhos bubalinos.

No Brasil, a ocorrência em bubalinos foi pesquisada por Lage et al. (1996) utilizando a virusneutralização (VN). Os autores encontraram 52,7% (116/220) de animais reagentes no Estado de Minas Gerais.

Silva et al. (2001) determinaram no Estado do Pará 16,09% (113/815) de prevalência da infecção pelo vírus da diarreia bovina a vírus (VBVD) através da utilização de um teste de ELISA comercial.

2.4 Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR)

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)/vulvovaginite infecciosa bovina (IBV) é enfermidade do trato respiratório e reprodutivo, constituindo-se também em causa de abortos. Descrita inicialmente por MILLER (1955) nos Estados Unidos, acarreta traqueíte, rinite, febre, conjuntivite, vulvovaginite e balanopostite, além de encefalite (KAHRS, 1977; RIET-CORREA et al., 1989; RODRIGUES e FERNANDEZ, 1987; WEIBLEN et al., 1989; WEIBLEN et al., 1991). Quando fêmeas susceptíveis gestantes são infectadas, pode ocorrer o aborto, haver nascimento de bezerro com doença sistêmica aguda, ou ainda o nascimento de bezerros aparentemente normais que morrem em poucos dias (MILLER, 1991).

De fácil transmissão e distribuição cosmopolita, o agente etiológico é um vírus DNA, pertencente à família *Herpesviridae*, gênero *Alphaherpesvirus*, sendo conhecido como Herpesvírus bovino tipo 1 - HVB-1 (GIBBS e RWEYEMANU, 1977). É um vírus envelopado, e replica-se em cultivos celulares, produzindo efeito citopático (OIE, 2003).

Uma das principais características desta família é a indução do estado de latência. Animais infectados pelo HVB-1 tornam-se portadores permanentes, com o vírus permanecendo em células do sistema nervoso central. Sob condições estressantes o vírus pode recrudescer e migrar através das fibras nervosas à periferia, onde se multiplica e é excretado. Infecções latentes com recrudescência periódica são fontes de vírus (ROCHA et al., 1998).

A transmissão ocorre através da monta natural ou inseminação artificial e por aerossóis. Há grande quantidade de vírus em secreções respiratórias, oculares e genitais. Os

sinais clínicos são variados, podendo diferir pela cepa do vírus, dose e via de exposição do animal. Bovídeos de todas as idades são susceptíveis (WEIBLEN, 1992).

Na Malásia, Saw et al. (1985) encontraram 65,1% do rebanho bubalino reagentes para o HVB-I. Aruna e Babu (1992), em trabalho realizado com bubalinos na Índia, constataram 21,1% (236/1121) na prova de hemaglutinação (HA). Verificaram ainda que a infecção pelo vírus da IBR aumenta com o avanço da idade dos animais. Também na Índia, Renukaradhya et al. (1996) encontraram 52,5% (63/120) de bubalinos reagentes mediante o emprego do teste de ELISA, e Chinchkar et al. (2002) encontraram 33,91% (155/458) utilizando a prova de VN.

No Brasil, o primeiro isolamento foi realizado por Alice (1978) na Bahia e por Mueller et al. (1978) em São Paulo. Investigações epidemiológicas em São Paulo para pesquisa de anticorpos anti-HVB-1 em bubalinos foram realizadas por Ikuno et al. (1984), que encontraram 58,2% (182/213), utilizando o teste de hemaglutinação (HA) e Fujii et al. (2001) detectaram frequência de 77,00% (171/222) em animais reagentes ao teste de ELISA indireto no mesmo Estado.

Lage et al. (1996) encontraram 14,7% (35/238) de animais reagentes à prova VN no Estado de Minas Gerais.

Na região Norte, Munchow e Pizarz (1994) no Amazonas, utilizando o teste de ELISA, encontraram 58,8% (506/861) de reagentes. Em diferentes municípios da Ilha do Marajó, Estado do Pará, Silva (1996) verificou variação de 27,12% a 75,31% de animais reagentes à VN. Ainda neste Estado, Molnar et al. (2001a) através do emprego de ELISA indireto, observaram 27,60% (122/442) de animais positivos para IBR na Ilha de Marajó.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram examinadas 241 amostras séricas de búfalos da raça Murrah, Jafarabadi e suas crias em idade de reprodução (três a 16 anos), no ano 2002, provenientes do município de Taipu, Rio Grande do Norte. Os animais não eram submetidos a programas de vacinação contra diarreia bovina a vírus, rinotraqueíte infecciosa bovina nem brucelose.

Os animais são oito machos e 233 fêmeas criados com a finalidade leiteira, sendo a ordenha realizada mecanicamente. São mantidos no pasto, recebem água *ad libitum* e são recolhidos para pernoite.

Para a realização desta pesquisa os procedimentos foram classificados na categoria B, de acordo com os Princípios Internacionais para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (UNIFESP, 2004), adaptado do International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS, 1985) e todos os procedimentos realizados estão de acordo com o Consensus Recommendations on Effective Institutional Animal Care and Use Committees (NIH, 1987).

3.2 ÁREA ESTUDADA

O município de Taipu localiza-se no Estado do Rio Grande do Norte (Anexo 01), Mesorregião Litoral Nordeste (Anexo 02), na latitude 5°37'18''S e longitude

35°35'48''O, a 50 quilômetros (km) de Natal, capital do Estado. Possui uma população de 461 cabeças de bubalinos, das raças Murrah, Jafarabadi e híbridos.

3.3 OBTENÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram colhidos dados referentes aos animais estudados, conforme questionário em anexo (Anexo 03).

3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS LABORATORIAIS

O tamanho da amostra para cálculo da frequência de animais reagentes para *B. abortus*, *M. bovis*, BVDV e HVB-1 foi determinado em função da menor prevalência estimada, que foi de 7,5% com relação à brucelose na Bahia (DEL'REI et al., 2002), grau de confiança almejado (95%) e margem de erro esperado (5%). Foi aplicada a fórmula do *Centro Panamericano de Zoonosis* (CEPANZO, 1979) para estudos de prevalência por amostragem, em compilação elaborada por Reis (2003).

O *n* estabelecido foi 144, porém devido à facilidade na ocasião da coleta o número de amostras tornou-se superior. O nível de confiança foi de 95 % para os quatro agentes objetos deste estudo.

As amostras séricas foram obtidas mediante punção da veia lateral da cauda dos animais, utilizando-se de agulhas descartáveis¹ e tubos de ensaio estéreis², mantidos inclinados em repouso. Após a formação do coágulo, os soros obtidos foram transferidos

¹ Agulha de 40x12 - Bencton & Dickson

² Tubos de ensaio 13 x 100 mm

para tubos plásticos tipo “eppendorf”³ devidamente identificados e mantidos a -20°C até a realização das provas sorológicas para a detecção de anticorpos para as enfermidades brucelose, BVD e IBR.

3.5 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

3.5.1 TESTE INTRADÉRMICO PARA TUBERCULOSE

Os 241 animais foram testados conforme determina o Programa Nacional para o Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNEBT) do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2004). Foi realizado o teste cervical comparativo (TCC), com o emprego da técnica de tuberculinização intradérmica dupla comparativa, empregando *Pure Protein Derivate* (PPD) bovino e PPD aviário, em inoculações intradérmicas de 0,1 mL (dose correspondente de 5.000 UI da PPD bovina e de 2.500 UI da PPD aviária) com o emprego de seringas descartáveis estéreis de 1,0 mL na tábua do pescoço (lado direito) dos animais, a 20 cm de distância uma da outra. A espessura da pele foi medida antes da aplicação e após 72 horas utilizando-se um cutímetro. A interpretação foi feita de acordo com o referido Programa (BRASIL, 2004), para verificar o número de animais com reações imunoalérgicas presentes.

³ Eppendorf Reaktiosgerafafe, Marca Geratebau

3.5.2. SOROLOGIA PARA BRUCELOSE

Empregou-se para pesquisa de anticorpos específicos anti-*Brucella* a técnica do antígeno acidificado tamponado (AAT) como teste triagem, sendo as amostras que apresentaram reações positivas submetidas subseqüentemente às técnicas de soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-ME) (BRASIL, 2003). A realização e a interpretação das provas ocorreram de acordo com o Programa Nacional para o Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) e a Instrução Normativa sobre o regulamento técnico do PNCEBT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003; BRASIL, 2004).

3.5.2.1. ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO (AAT)

Após o descongelamento, com auxílio de uma pipeta automática, 30 µL de cada amostra sérica foram colocados sobre placa de vidro, e em seguida 30 µL do antígeno. Homogeneizou-se então com bastão de vidro, e decorridos quatro minutos foi realizada leitura com auxílio de luz indireta, e consideradas reações positivas aquelas amostras que apresentaram formação de grumos.

3.5.2.2. SOROAGLUTINAÇÃO LENTA EM TUBOS (SAL)

Em série de quatro tubos de vidro 10 x 100mm com auxílio de pipetas de Bang, os soros foram diluídos nas proporções de 1:25 (0,08 mL), 1:50 (0,04 mL), 1:100 (0,02 mL) e 1:200 (0,01 mL). Foi adicionado a cada tubo 2 mL do antígeno diluído a 1% em

solução salina com 0,5% de fenol. Os tubos foram tampados e as suspensões formadas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 horas, sendo consideradas as reações conforme leitura com o auxílio de luz artificial indireta.

3.5.2.3. 2 – MERCAPTOETANOL (2–ME)

Em quatro tubos de vidro 10x100mm com auxílio da pipeta de Bang os soros foram diluídos nas proporções de 1:25 (0,08 mL), 1:50 (0,04 mL), 1:100 (0,02 mL) e 1:200 (0,01 mL), sendo adicionado a cada tubo 1 mL do 2–ME na diluição de trabalho (feita em solução salina). Após período de 30 minutos em repouso, adicionou-se em cada tubo 1 mL do antígeno diluído a 2% em solução salina 0,085%. Os tubos foram tampados e as suspensões formadas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, durante 48 horas, procedendo-se então a leitura, com o auxílio de luz artificial indireta.

3.5.3 SOROLOGIA PARA BVD E IBR

As amostras de soro foram testadas em triagem, sendo processadas pela prova de virusneutralização (VN) (OIE, 2003), em microplacas de poliestireno de 96 orifícios tratadas para cultivo celular.

Após inativação dos soros em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, os soros foram diluídos em meio essencial mínimo (MEM) na proporção de 1:5 (BVD) e soro puro (IBR), em quadruplicata, com 50 microlitros (μ L) da amostra por orifício. As cepas virais empregadas foram: Colorado (IBR) e NADL II (BVD), utilizando-se 100 DL₅₀ para cultivo celular.

A mescla soro/vírus foi colocada em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C durante uma hora, após a qual foi acrescentada suspensão de células de linhagem

contínua de rim de bovino – Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK), com concentração de 250.000 células/mL. As microplacas foram incubadas por cinco dias e realizadas leituras diárias para observação de efeito citopático.

A prova foi validada observando-se o comportamento esperado dos controles positivo, negativo, de células, de toxicidade dos soros em estudo e o de retrotitulação para o número de doses letais efetivamente utilizado na prova - mantido entre 30 e 300 DL₅₀.

Amostras positivas apresentaram neutralização completa na diluição 1:10 (BVD) e 1:2 (IBR), enquanto as amostras negativas apresentaram efeito citopático característico, nas mesmas diluições.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi constituída por análise de dispersão de freqüências utilizando-se o teste Qui-quadrado para testar a hipótese referente a associação entre as variáveis estudadas.

Quando se rejeitou a respectiva hipótese de nulidade efetivou-se, por conseguinte, o grau de associação das classificações da tabela de contingência, empregando-se o coeficiente de contingência (CC), pela seguinte fórmula:

$$CC = \sqrt{\frac{X^2_{\text{Cal}}}{X^2_{\text{Cal} + N}}} \quad \text{Onde N = soma das freqüências observadas}$$

A significância obtida na análise dos dados foi determinada ao nível de 5% de probabilidade (REIS, 2003). O “software” para obtenção dos cálculos foi o Minitab 13 para microcomputador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos 241 bubalinos testados se encontram expressos para as diferentes enfermidades na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das frequências absoluta e relativa dos resultados aos testes empregados no diagnóstico de enfermidades bacterianas e virais em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004

Frequências	Enfermidades								Total por enfermidade
	Brucelose ^(a)		Tuberculose ^(b)		BVD ^(c)		IBR ^(c)		
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	
Absoluta	78	163	58	183	185	56	120	121	241
Relativa (%)	32,37	67,63	24,07	75,93	76,76	23,24	49,79	50,21	100,00

R - Reagente; NR – Não reagente; ^(a)AAT, SAL e 2-ME; ^(b)TCC; ^(c)VN

4.1 Brucelose

Os resultados obtidos evidenciaram que 32,37% (78/241) dos animais foram reagentes para brucelose, e 67,63% (163/241) não reagentes (Tabela 1).

Os resultados aqui obtidos foram superiores aos valores citados na literatura internacional por Refai (2002) no Egito; Isloor et al. (1998) e Renukaradhya et al. (2002) na Índia, que utilizaram a SAL e o AAT.

Com relação ao Brasil, os resultados aqui registrados são superiores àqueles encontrados no Estado de São Paulo por Sandoval et al. (1979) que utilizaram a SAR; Feitosa et al. (1991) mediante o emprego da SAL e Fujii et al. (2001) com o mesmo teste. Também superam os resultados encontrados no Estado de Goiás com a SAR por Costa et al. (1973) e no Estado da Bahia por Del’Rei et al. (1990) utilizando a SAL, e ainda os valores obtidos no Estado do Amazonas por Munchow e Pisarz (1994) e no Estado do Pará por Lopes et al. (1999) e Molnar et al. (2001b) com o emprego de ELISA competitivo.

Vale salientar que os resultados foram inferiores àqueles descritos por Matias e Pinto (1983) ao empregarem as provas do AAT e de fixação do complemento (FC), que encontraram índices de 38,2% (81/212) e 46,7% (99/212) respectivamente. Molnar et al. (2001b) utilizando ELISA competitivo, observou soropositividade de até 78,84% no Estado do Pará.

Segundo o MAPA (BRASIL, 2003) a brucelose bovina e bubalina está distribuída de forma endêmica no Brasil, independentemente das formas de criação ou exploração as quais estejam submetidos os rebanhos, comprometendo significativamente a produtividade dos plantéis, e, conseqüentemente, a produção nacional e as exportações. Como os dados obtidos, a população bubalina estudada não foge deste contexto.

A freqüência de animais positivos para brucelose observada neste estudo assemelhou-se aos observados por Vasconcellos et al. (1987), que relataram índices mais altos de infecção em gado leiteiro, destacando rebanhos da América Latina.

Fato relevante é o de não ter sido praticada quarentena nem exames nos animais adquiridos, tão pouco era realizada a vacinação para brucelose, o que pode ter contribuído para o número de animais positivos encontrados no presente estudo.

Os resultados encontrados neste estudo possivelmente se devem também ao tipo de manejo adotado (semi-intensivo), que permite contato íntimo entre os animais, e durante a manutenção destes no pasto, permite o acesso irrestrito destes com restos de abortos ou partos contaminados.

Dos oito machos que integravam o plantel, dois (25,00%) foram reagentes para brucelose, fato que pode ter contribuído para a elevada frequência da doença no plantel. Guarino et al. (2001) admitem a monta natural como importante meio para a presença e disseminação da brucelose bubalina, realidade esta semelhante à encontrada no rebanho brasileiro.

Das 233 fêmeas testadas, 25 possuíam histórico de aborto, e 22 delas apresentaram-se entre as 76 reagentes para brucelose. Langenegger (1992a) considera que a principal forma de transmissão da enfermidade se dá através do contato de animais susceptíveis com restos de abortos contaminados.

A Mesorregião do Litoral Nordeste onde está estabelecida a população estudada, se constitui em uma região agroecológica de clima tropical com seis meses de chuva ao ano, o que pode favorecer a manutenção da *B. abortus* neste período do ano, quando a umidade é mais elevada, uma vez que, exemplificando, este agente infeccioso pode permanecer viável por cerca de 100 dias em água, e 180 dias em um feto à sombra (BRASIL, 2003).

Vale salientar que mesmo em áreas secas, quando os animais são mantidos no pasto com contato irrestrito, a prevalência pode ser maior do que em áreas úmidas com o contato entre animais controlado (SILVA et al., 2000).

Tendo em vista a diferença na sensibilidade e especificidade dos testes, as diferenças aqui observadas podem ser resultado dos diferentes testes sorológicos apresentados. Nicoletti (1992) concluiu que a prova de FC era de utilidade limitada no diagnóstico da brucelose em búfalos devido à presença de falso-positivos. Guarino et al. (2001) assegura que o teste de FC deve ser empregado como teste confirmatório da brucelose bubalina. Em virtude da alta concordância do AAT e 2-ME, Megid et al. (2000) sugerem a utilização do teste de AAT na triagem para o diagnóstico da brucelose bovina, o que vem sendo atualmente praticado pelas normas do Programa Nacional para o Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2004). Segundo o programa, os testes de SAL e 2-ME devem ser empregados como confirmatórios após o AAT. Resultados inconclusivos devem ser examinados posteriormente pelo teste de FC ou outro que o substitua, devendo ser utilizado também para o trânsito internacional. A recomendação do OIE (2003) consiste na realização dos testes de AAT, FC e ELISA, e de forma complementar, o teste de polarização de fluorescência (FPA).

Poester et al. (2002) expressam o pensamento comum de que este novo programa para o controle da brucelose do MAPA, que tem como orientação imunização de fêmeas jovens, segregação e sacrifício dos animais sororreagentes, traz grandes expectativas na luta contra esta enfermidade no país.

Foi testada a associação entre a presença de anticorpos anti-*Brucella abortus* com relação a animais reagentes para tuberculose, BVD e IBR a fim de determinar o grau de coincidência entre os resultados dos testes e verificar a existência ou não de associação significativa entre as infecções.

Comparando-se os resultados obtidos para brucelose com os de tuberculose, observou-se que 8,3% dos animais testados (20/241) reagiram para ambas as enfermidades, enquanto que 51,87% (125/241) dos animais apresentaram resultado negativo para brucelose e para tuberculose (Tabela 2). Dentre os animais positivos para brucelose, 74,36% (58/78) não reagiram à tuberculinização. Dos animais negativos para brucelose, 23,31% (38/163) foram reagentes para tuberculose.

Tabela 2 – Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos Testes para brucelose e tuberculose em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004

Brucelose	Tuberculose				Total	X^2_{Cal}	Nível de p
	Positivo		Negativo				
	FA	FR (%)	FA	FR (%)			
Positivo	20	8,30	58	24,06	78		
Negativo	38	15,77	125	51,87	163	0,156	0,692
Total	58		183		241		

FA- Frequência Absoluta; FR – Frequência Relativa

$$X^2_{1gl} = 3,84$$

Os resultados obtidos no teste X^2 (qui-quadrado) demonstraram ausência de associação entre a infecção por *B. abortus* e *M. bovis*.

Ao serem comparadas as prevalências de animais reagentes para brucelose e para BVD, foi observado que 25,31% (61/241) dos animais reagiram concomitantemente para ambas as enfermidades. Foram negativos para ambas as enfermidades 16,19% (39/241) dos animais (Tabela 3). Observou-se que 21,79% (17/78) dos animais positivos

para brucelose foram negativos para BVD; e 51,45% (124/163) dos animais negativos para brucelose eram reagentes para BVD.

Tabela 3 – Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos Testes para brucelose e BVD em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004

Brucelose	BVD				Total	X^2_{Cal}	Nível de p
	Positivo		Negativo				
	FA	FR (%)	FA	FR (%)			
Positivo	61	25,31	17	7,05	78		
Negativo	124	51,45	39	16,19	163	0,134	0,714
Total	185		56		241		

FA- Frequência Absoluta; FR – Frequência Relativa

$$X^2_{1gl} = 3,84$$

Foi verificado que não houve associação entre animais reagentes aos testes para *B. abortus* e BVDV.

Na comparação das ocorrências de animais reagentes para brucelose e para IBR, foi verificado que 21,58% (52/241) dos animais reagiram concomitantemente para ambas as enfermidades, e foram negativos para ambas as enfermidades 39,42% (95/241) dos animais (Tabela 4). Observou-se ainda que dos animais positivos para brucelose, 33,33% (26/78) foram negativos para IBR, e 58,28% (95/163) dos animais negativos para brucelose eram reagentes para IBR.

Tabela 4 – Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para brucelose e IBR em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004

Brucelose	IBR				Total	X^2_{Cal}	Nível de p
	Positivo		Negativo				
	FA	FR (%)	FA	FR (%)			
Positivo	52	21,58	26	10,78	78		
Negativo	68	28,22	95	39,42	163	13,135	0,001
Total	120		121		241		

FA- Frequência Absoluta; FR – Frequência Relativa

$X^2_{1gl} = 3,84$

O resultados do teste de X^2 (qui-quadrado) aplicado entre as variáveis estudadas (sendo o valor de X^2_{Cal} é maior que o do X^2_{tab}) evidenciou a associação entre a frequência de ocorrência entre as infecções por *Brucella abortus* e HVB-I nos bubalinos criados no município de Taipu – RN.

4.2 Tuberculose

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que foram positivos à tuberculinização 24,07% dos animais testados (58/241), enquanto que os não-reagentes corresponderam a 75,93% (183/241).

Os dados aqui encontrados acham-se próximos daqueles observados por Mohan (1968) na Índia e no Paquistão. Contudo, os dados deste trabalho foram inferiores aqueles

apresentados por Selim et al. (1978), que detectaram 68,00% de reagentes em bubalinos do Egito.

Ao serem comparados os resultados expressos na Tabela 1 com os dados nacionais, pode-se observar que os dados foram superiores àqueles apresentados por Portugal et al. (1971) no Estado de São Paulo. Esta diferença já foi constatada por Lilenbaum (2000) em bovinos, ao apontar os maiores índices de positividade nos Estados do Norte e Nordeste, e os menores nos Estados do Sul e Sudeste.

Mota et al. (2002) no Município de Parintins, Amazonas obtiveram 20,41% de positividade ao mesmo teste, evidenciando valores inferiores, porém próximos aos do presente estudo.

Segundo Mota e Nakajima (1992) o confinamento tem importância na difusão da doença no rebanho, o que explica a maior prevalência em gado leiteiro. Os mesmos autores citam os búfalos da Ilha de Marajó como um exemplo de “confinamento natural temporário” na época das cheias quando o gado se aglomera nas partes altas ou no inverso, quando procuram águas estagnadas em secas prolongadas. Os búfalos criados para finalidade leiteira, de forma semi-intensiva, são submetidos a contato íntimo na prática de manejo diário. O MAPA (BRASIL, 2003) destaca ainda que a prevalência no gado leiteiro é superior em relação ao gado de corte.

Como se observou em relação à tuberculose bovina, em bubalinos a enfermidade também apresenta dados bastante diferenciados devido à dimensão territorial e às características regionais, ocorrendo, contudo, em todo o país (BRASIL, 2003).

Na comparação dos resultados de animais reagentes para tuberculose e para BVD, foi observado que 19,92% (48/241) mostraram-se reagentes para ambas as enfermidades e 19,08% (46/241) dos animais resultaram não reagentes para ambas (Tabela

5); 17,24% (10/58) dos que se apresentaram positivos para tuberculose foram negativos para BVD e 74,86% (137/183) dos animais negativos para tuberculose apresentaram-se reagentes para BVD.

Tabela 5 – Associação entre as freqüências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para tuberculose e BVD em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004

Tuberculose	BVD				Total	X^2_{Cal}	Nível de p
	Positivo		Negativo				
	FA	FR (%)	FA	FR (%)			
Positivo	48	19,92	10	4,15	58		
Negativo	137	56,85	46	19,08	183	1,539	0,215
Total	185		56		241		

FA- Freqüência Absoluta; FR – Freqüência Relativa
 $X^2_{\text{1gl}} = 3,84$

Não foi constatada associação entre resultados de bubalinos reagentes aos testes para *M. bovis* e BVDV.

Comparando-se a ocorrência de animais reagentes para tuberculose e para IBR, foi observado que 12,45% (30/241) dos animais reagiram concomitantemente para ambas as enfermidades. Foram negativos para as duas enfermidades 38,59% (93/241) dos animais (Tabela 6); 48,27% (28/58) dos que se apresentaram positivos para tuberculose foram negativos para IBR e 49,18% (90/183) dos animais negativos para tuberculose eram reagentes para IBR.

Tabela 6 – Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para tuberculose e IBR em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004

Tuberculose	IBR				Total	X^2_{Cal}	Nível de p
	Positivo		Negativo				
	FA	FR (%)	FA	FR (%)			
Positivo	30	12,45	28	11,62	58		
Negativo	90	37,34	93	38,59	183	0,114	0,736
Total	120		121		241		

FA- Frequência Absoluta; FR – Frequência Relativa

$X^2_{\text{Igl}} = 3,84$

O resultado do teste de X^2 aplicado entre as variáveis estudadas não demonstrou associação entre as infecções por *M.bovis* e HBV-1.

4.3 Diarréia Viral Bovina (BVD)

Para BVD 76,76% (185/241) dos animais apresentaram-se reagentes à prova de VN e 23,24% (56/241) foram não-reagentes (Tabela 1).

Os resultados aqui apresentados foram superiores àqueles encontrados por Lage et al. (1996), através da vírusneutralização (VN) no Estado de Minas Gerais e Silva et al. (2001) com a utilização de ELISA comercial em bubalinos no Estado do Pará.

Como se observou, e de acordo com Almeida et al. (2000) em inquérito realizado em bovinos, há indicação de grande atividade do vírus no rebanho estudado, uma vez que os animais não receberam vacina contra este vírus. Dentre os 185 animais

reagentes, havia quatro machos e 181 fêmeas. Destas, 20 apresentaram histórico de aborto. A prevalência encontrada é um componente da epidemiologia da BVD que necessita ser mais profundamente estudado no sentido de se obter um modelo para esta infecção na área estudada. A ausência de sinais clínicos característicos da infecção aguda leva a considerar a possibilidade de ocorrência de infecção subclínica (BROWNLIE, 1990). Vale destacar que Langenegger (1992c) lembra que animais reagentes geralmente não apresentam problemas, pois são imunocompetentes frente à BVD, sendo os animais sorologicamente negativos susceptíveis à enfermidade.

Comparando-se a ocorrência de animais reagentes para BVD e para IBR, verificou-se que 38,60% (93/241) dos animais foram reagentes para ambas as enfermidades simultaneamente, e 12,03% (29/241) dos animais apresentaram-se não reagentes para BVD e IBR (Tabela 7). Dos animais reagentes para BVD, 49,72% (92/185) apresentaram-se não reagentes para IBR; e 48,21% (27/56) dos animais negativos para BVD resultaram reagentes para IBR.

Tabela 7 – Associação entre as frequências dos animais reagentes e não reagentes aos testes para BVD e IBR em búfalos criados no Município de Taipu – RN, 2004

BVD	IBR				Total	X^2_{Cal}	Nível de p
	Positivo		Negativo				
	FA	FR (%)	FA	FR (%)			
Positivo	93	38,60	92	38,17	185		
Negativo	27	11,20	29	12,03	56	0,073	0,787
Total	120		121		241		

FA- Frequência Absoluta; FR – Frequência Relativa

$$X^2_{1gl} = 3,84$$

Observou-se que não ocorreu associação entre animais reagentes aos testes de VN empregados para detecção de anticorpos para BVDV e HVB-1.

4.4 IBR

De acordo com os dados na Tabela 1 relativos à prova de VN para IBR, 49,79% (120/241) dos animais mostraram-se reagentes à prova, enquanto que 50,21% (121/241) apresentaram-se não-reagentes.

Os resultados aqui apresentados foram superiores aos dados observados por Aruna e Babu (1992), que utilizaram a HA e Chinchkar et al. (2002) com a prova de VN na Índia; Lage et al. (1996) pela prova de VN no Estado de Minas Gerais; Molnar et al. (2001a) com emprego de ELISA indireto na Ilha de Marajó e Silva (1996) mediante a VN no Pará.

Os dados deste estudo estão próximos embora ainda superiores àqueles apresentados por Renukaradhya et al. (1996) que utilizaram o teste de ELISA e Ikuno et al. (1984) utilizando o teste de HA.

Contudo, os presentes valores foram inferiores aos relatados por Saw et al. (1985) na Malásia, que encontraram 65,1% do rebanho bubalino reagentes; Fujii et al. (2001) que detectaram a frequência de 77,00% de animais reagentes ao teste de ELISA indireto no Estado do Pará, e Silva (1996) que encontrou até 75,31% de animais reagentes ao teste VN no mesmo Estado.

Carbrey et al. (1971) enfatizam que a confirmação laboratorial através da detecção de anticorpos séricos é essencial, pois o achado de anticorpos neutralizantes em

bovinos leva à conclusão de que os animais foram previamente infectados ou receberam imunidade materna. Segundo Fuji et al. (2001), é importante reunir dados da soroprevalência dos agentes na região para auxílio na interpretação dos testes sorológicos. Aruna e Babu (1992), na Índia, verificaram ainda que a infecção pelo vírus da IBR aumenta com o avanço da idade. Ressaltamos que a população bubalina estudada é constituída por animais em idade reprodutiva, o que pode contribuir para a prevalência (49,79%) encontrada. Das 116 fêmeas reagentes, 14 já abortaram, e houve quatro machos sororreagentes.

Del Fava et al. (1998) em estudo realizado em rebanho bovino infectado por HVB-1, relatam que as vacas se constituíram na fonte da infecção para o rebanho. Com relação à brucelose, as fêmeas representam igualmente papel crucial na disseminação da infecção nos plantéis, uma vez que são os produtos de abortos a principal via de infecção da enfermidade.

As condições de manejo dos bubalinos estudados podem favorecer a permanência das infecções, e deve ser ressaltado que os animais não eram investigados para a existência ou não de animais reagentes, e o contato entre os mesmos se dá livremente. Animais adquiridos não eram testados nem submetidos a quarentena quando introduzidos no plantel.

Uma vez que foi demonstrada a associação entre a frequência de ocorrência entre as infecções por *Brucella abortus* e HVB-I nos bubalinos criados no município de Taipu – RN, tal realidade parece estar ligada ao que dizem Rocha et al. (1998), ao afirmarem que fator importante na transmissão da IBR e da manutenção desta infecção nos rebanhos é que os animais infectados pelo HVB-1 tornam-se portadores por toda a vida, sendo que o vírus se estabelece de forma latente em seus gânglios nervosos.

Animais submetidos a estresse como infecção intercorrente podem apresentar depressão do sistema imune com a quebra do estado de latência viral, possibilitando a reativação da infecção, com ou sem sintomas clínicos, e re-excreção do vírus para o ambiente (ROCHA et al., 1998).

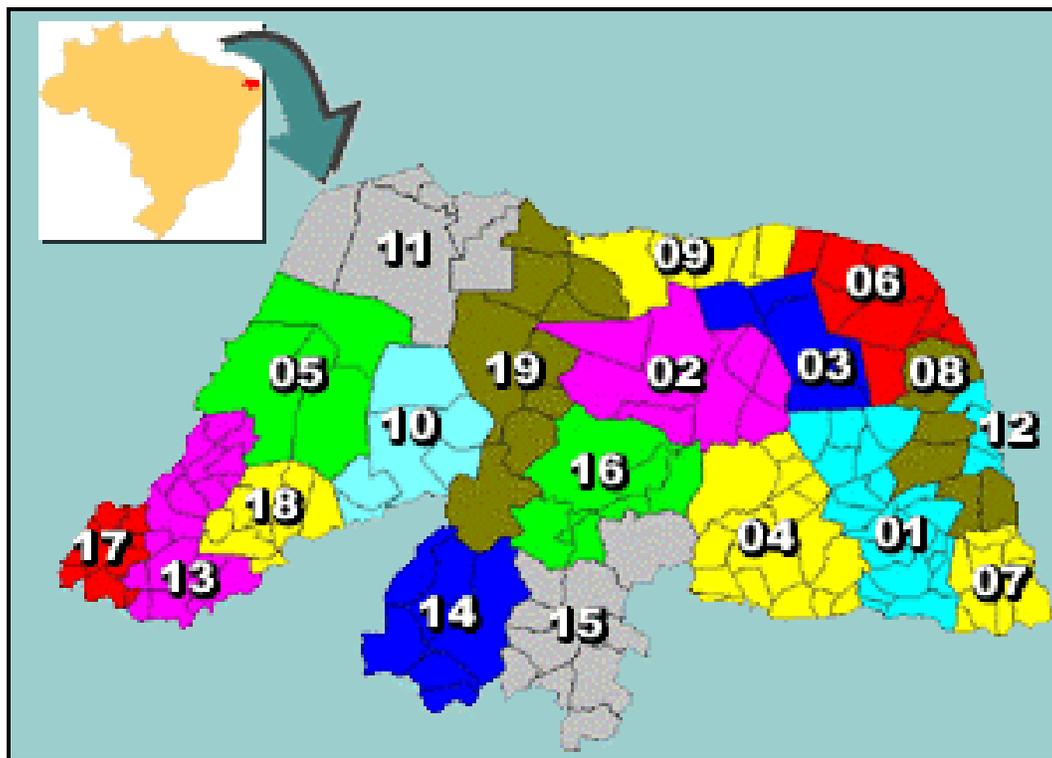
O valor do Coeficiente de Contingência foi de 23%, demonstrando segundo Reis (2003), que embora ocorra associação entre a infecção por *B. abortus* e HVB-1, as enfermidades estão fracamente associadas. Segundo Fujii et al. (2001), o estudo simultâneo da frequência de ocorrência de diferentes agentes de abortamento possibilita avaliar a importância de cada um deles, para que se possa adotar medidas adequadas de controle.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

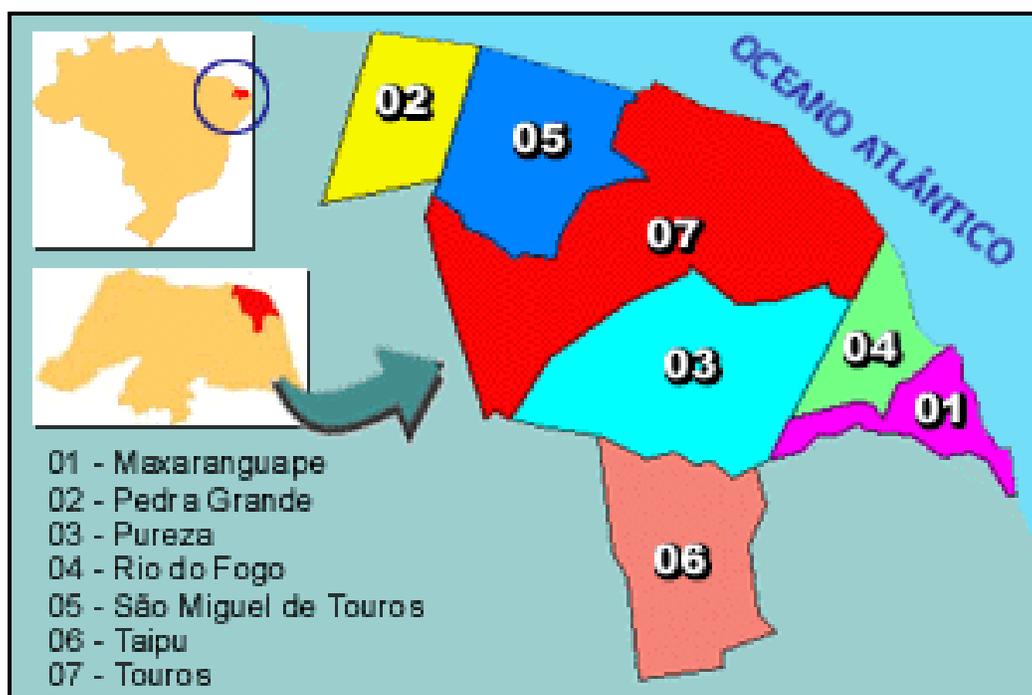
1. A alta frequência de anticorpos anti-*Brucella abortus* associados a vírus HVB-1 demonstra que estes agentes podem estar implicados nos problemas reprodutivos na população bubalina estudada e de saúde pública.
2. A alta frequência de animais reagentes à tuberculinização indica que o *M. bovis* está consideravelmente difundido entre búfalos em idade reprodutiva no município estudado.
3. As elevadas frequências de anticorpos anti-BVDV evidencia atividade viral na região estudada, sendo necessário, dentre os bubalinos não reagentes, investigar a ocorrência ou não de persistentemente infectados como fonte de infecção para os susceptíveis.

ANEXO 01 - MAPA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE



Rio Grande do Norte: Mesorregião 06 – Litoral Nordeste

ANEXO 02 - MAPA DA MESORREGIÃO DO LITORAL NORDESTE



Mesorregião do Litoral Nordeste: 06 - Localização do Município de Taipu - RN

ANEXO 03 - QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO

Data da colheita: ____/____/____

Propriedade:	
Proprietário:	
Finalidade:	
Histórico de vacinação:	
Pratica quarentena?	
Repetição de cio?	
Crias debilitadas?	
Abortos?	
Queda de produção?	
Ocorrência de endometrites?	
Retenção de placenta?	
Outras queixas?	
Presença de outros animais?	

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁴

ABCB - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS: **Trabalhos**. 2003. Disponível na internet <http://www.bufalo.com.br/home.htm>. Capturado em 12 Nov. 2003.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - **Informação e documentação – referências – elaboração: NBR 6023,23p./ citações em documentos – apresentação:NBR 10520**. 7p.Rio de Janeiro, 2002.

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil (nota prévia). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.38, n.4, p. 919-20, 1978.

ALMEIDA, H.J.O. et al. Prevalência de bovinos sororreagentes para Brucella abortus, Leptospira interrogans e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos do Município de Sanharó – PE. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.3, n.2, p.93-101, 2000.

ARUNA, D.; BABU, T. S. Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vírus antibodies in buffaloes of Andhra Pradesh. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.62, n.6, p.540-1, 1992.

BAKER, J.C. Bovine viral diarrhea virus: a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.190, n.11, p. 1449-58, 1987.

BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet. Clin. North America**, v.11, p.425-45, 1995.

BOLIN, S.R. The pathogenesis of mucosal disease. **Vet. Clin. North America**, v.11, p.489-500, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT:versão preliminar**. Brasília, 2003. 133p.

BRASIL, Secretaria de Defesa Agropecuária, 2004. **Instrução normativa** n.6, 08 Jan 2004. Diário Oficial, 12 Jan 2004. Seção 1, p.6.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Veterinary Record**, London, v.114, p.535-6, 1984.

BROWNLIE, J. Clinical aspects of bovine virus diarrhea/mucosal disease complex in cattle. **In Practice**, v.7, p.195-202, 1985.

⁴ Normas ABNT-2002

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infectious. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v.9, n.1, p.43-90, 1990.

BUCKNER, R; GRUNDER, H.D. Clinical, serological and virological findings in cattle with acute, sub-acute and chronic mucosal disease. **The bovine practitioner**, v.29, p.119-24, 1995.

CARBREY, E.A. et al. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhoea and shipping fever (parainfluenza-3). **Proceedings US Animal Health Association**, v.75, p.629-48, 1971.

CARMAN, S. et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. **J.Vet. Diag. Invest**, v.10, p.27-35, 1998.

CEPANZO. Procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires. Argentina. **Nota técnica**, n.18, p. 28-29. OPS/OMS. 1979.

CHAVES FILHO, N. F.C.; TAVARES, H.L. Bubalinocultura: Potencial e Perspectivas para o Estado de Pernambuco. Recife. **Comunicado Técnico do IPA**, v.45, p.3-10, 1992.

CHILDS, T. Disease of cattle – Saskatchewan. **Canadian Journal Comparative Medicine**, Gardenvale, v.10, p.316-9, 1946.

CHINCHKAR, S.R. et al. Seroprevalence of Infectious Bovine Rhinotracheitis in Maharashtra state. **Indian Veterinary Journal**, v.79, n.1, p.78-9, 2002.

CIOMS – COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES: **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Disponível na internet http://www.cioms.ch/1985_texts_of_guidelines.htm. Capturado em 16 Jan 2004.

COCKRILL, W.R. **The husbandry and health of the domestic buffalo: Management, conservation and use**. Rome. FAO, p276-312, 1974.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p. 213-21, 1997.

COSTA, E.O.; CURY, R.; ROCHA, U.F. Sobre a ocorrência da brucelose em búfalos *Bubalus bubalis* (Linnaeus, 1785) no estado de Goiás. Inquérito sorológico. São Paulo. **Biológico**, v.39 p.162-4, 1973.

DEL FAVA, C. et al. Erradicação do herpesvírus bovino-1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.2, p.65-8, 1998.

DEL'REI, A.J.; BARTOLOMEU, C.C.; SANTOS, J.V. et al. Seroprevalence of brucellosis in buffaloes in regions of different climate and soil in the Bahia State - Brazil. In:

Proceedings of the 1st Buffalo Symposium of Americas, 2002. Belém – PA, p.361-3, 2002.

DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinical North America**, v.11, p.393-423, 1995.

FEITOSA, M. H.; BITTAR, C.R.; GOMES, S.P. Brucelose: Levantamento sorológico no Estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.3, n.2, p.9-15, 1991.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAOSTAT: **Agriculture data**. 1999. Disponível na internet <http://apps.faoorg/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/>. Capturado em 27 Jan. 2004.

FRAULO, P; GALIERO, G. Buffalo brucellosis: epidemiologic survey in Salerno province (Italy). **Bubalus bubalis**, v.2, p.3-8, 1999.

FUJII, T.U.; KASAI, N.; VASCONCELLOS, S.A. Anticorpos anti-*Neospora caninum* e outros agentes de abortamentos em búfalas da região do vale do ribeira, São Paulo. Brasil. São Paulo, **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.5-9, 2001.

GAGLEAZZI, U.A. et al. Produção e consumo de carne bubalina no Brasil. **Revista Nacional da carne**, v.214, 2003. Disponível na Internet http://www.dipemar.com.br/carne/314/materia_arttec_carne.htm. Capturado em 18 Nov. 2003.

GARCIA-CARRILO, C. Situacion de la brucelosis en las Americas. **Comunidade Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.8, n.2, p.53-60, 1984.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMANU, M.M. Bovine herpesvirus. **Veterinary Bulletin**, Slough, v.47, p.317-43, 1977.

GUARINO, A. et al. Indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. **Veterinary Record**, Portici, v.149, p.88-90, 2001.

HORZINEK, M. C. Bovine virus diarrhea virus: An introduction. **Revue Scientifique et Techniques Office International des Epizooties**, Paris, v.9, n.1, p.13-23, 1990.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinical of North America**, v.11, p.521-547, 1995.

IKUNO, A.A. et al. Presença de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado de São Paulo. **Biológico**, v.50, n.6, p.131-8, 1984.

ISLOOR, S.; RENUKARADHYA,G.J.; RAJASEKHAR, M. A serological survey of bovine brucellosis in India.; v.17, n.3, p.781-5, 1998.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **Journal of American Veterinary Association**, v.171, n.10, p.1055-64, 1977.

KIRKLAND, P.D.; MACKINTOSH, S.G.; MOYLE, A. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. **Veterinary Research**, v.135, p.527-529, 1994.

LAGE et al. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v.49, n.3, p.195-7, 1996.

LANGENEGGER, J. Brucelose. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: CNPGL, p.83-86, 1992a.

LANGENEGGER, J. Tuberculose. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: CNPGL, p.97-121, 1992b.

LANGENEGGER, J. Diarréia Viral Bovina. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: CNPGL, p.2-23, 1992c.

LAU, H.D. **Doenças em Búfalos no Brasil: diagnóstico, epidemiologia e controle**. Belém. EMBRAPA-CPATU, 1999. 202p.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, n.4, 2000.

LINDBERG, A.L.E.; ALENIUS, S. Principles of eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.197-222, 1999.

LOEHR, B.I. et al. Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. **Arch. Virology**, v.143, p.667-79, 1998.

LOPES, C.F.A.; MOLNAR, L.; MOLNAR, E.; Seroepidemiologic evaluate of **brucellosis** in animals and humans from bragantina zone in the Para State - Brazil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.3, p.429-31, 1999.

MATHIAS, L.A.; PINTO, A.A. Comparative study among complement fixation, serum agglutination and rose bengal plate tests in the serodiagnosis of bovine brucellosis. **International Journal of Zoonosis**, v.10, p.1-6, 1983.

MAQSOOD, M. Brucellosis in cattle in arid ragelands of Kohistan, Pakistan. **Pakistan Veterinary Journal**,1988.

McGOWAN, M.R. et al. Field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus infection around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.443-9, 1993.

MEGID, J, et al. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.37, n.5, p.00-00,2000.

MILLER , N.J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v.126, p.463-7, 1955.

MILLER, J.N. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, Lexena, v.86, n.1, p.95-8, 1991.

MOHAN, V. Disease and parasites of buffaloes. **Veterinary Bulletin**, v.38, p.647-59, 1968.

MOLNAR, E.; MOLNÁR, L.; WALE, W.G. Value of different serological tests in the diagnosis of bovine brucellosis in the Amazonian region. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.46, p.199-210, 1998.

MOLNAR, E. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em bubalinos e bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.252-4, 2001a.

MOLNAR, L. et al. Prevalência da brucelose em bubalinos no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.254-6, 2001b.

MOLNAR, L. et al. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.2, p.41-4, 2002.

MOTA, P.M.P.C. et al. Ocorrência de tuberculose em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*-Linneus, 1758) no Município de Parintins, Amazonas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.4, 2002.

MOTA, P.M.P.C.; NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: CNPGL, p.97-121, 1992.

MUELLER, S. B.K. et al. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto bovino (IBR/IPV). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.45, n.3, p.187-90, 1978.

MUNCHOW, A.U.; PIZARZ, M. Epidemiological studies of some economical significant infectious diseases in water buffaloes in the Central Amazon Region, Brazil. **Proceedings of the 4th World Buffalo Congress**, 1994. São Paulo – SP, v.2, n.353-5, p.27-30, 1994.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine Brucellosis. **Advance Veterinary Science**, v.24, p.69-98, 1980.

NICOLETTI, P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis en buffaloes (*Buballus bubalis*). **Tropical Animal Health**, v.24, p.40-4, 1992.

NIH – NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH: **Consensus Recommendations on Effective Institutional Animal Care and Use Committees**, 1987. Disponível na internet <http://www.nih.gov/grants/policy/regulatoryburden/animalcare.htm>. Capturado em Jan 16, 2004.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE, Disponível na internet http://www.oie.int/englen_index.htm. Capturado em 09 Jul. 2003.

OLAFSON, P.; MACCALUM, A.D.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v.36, p.205-13, 1946.

PATON, D.J. et al. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. **Veterinary Research**, v.124, p.63-4, 1989.

PATON, D.J.; BROCKMANN, S.; WOOD, L. Insemination of susceptible and preimmunized cattle with bovine viral diarrhea virus infected semen. **British Veterinary Journal**, London, v.142, n.2, p.171-3, 1990.

PERDRIZET, J.A. et al. Bovine virus diarrhea – clinical syndromes in dairy herds. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v.77, p.46-74, 1987.

POESTER, F.P.; THIESSEN, S.V. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande do Sul. **Memorias de XIV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, Acapulco-México, v.9, n.15, p.520-523, 1994.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.55–62, 2002.

PORTUGAL, M.A.S.C.; GIORGI, W.; SIQUEIRA, P.A. Ocorrência de tuberculose em rebanho bubalino (*Bubalus bubalis var. bubalis* – LINNEUS, 1758) no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.38, n.4, p.231-8, 1971.

PRITCHARD, W.R. et al. Virus diarrhea and mucosal disease. In: Annual Meeting of the US Livestock Sanit. Assoc., **Proceedings...**, 1955, p.173-88.

RAMSEY, F.K.; CHIVERS, W.H. Mucosal disease of cattle. **North American Veterinarian**, Evanston, v.34, p.629-33, 1956.

REFAI, M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.81–110, 2002.

REIS, J.C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Olinda, J.C.R., 2003, 651p.

RENUKARADHYA, G.J.; RAJASEKHAR, M.; RAGHAVAN, R. Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis in southern India. **Revue-Scientifique-et-Technique -Office-International-des-Epizooties**, v.15, n.3, p.1021-28, 1996.

RENUKARADHYA, G.J.; ISLOOR, S.; RAJASEKHAR, M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.183-195, 2002.

REVELL, S.G.; CHASEY, D.; DREW, T.W. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Record**, London, v.123, p.122-5, 1988.

RIET-CORREA, F. et al. Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino-I. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.9, n.1-2, p.13-6, 1989.

ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LEITE, R.C. O vírus da IBR e a inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.70-3, 1998.

RODRIGUES, L.L.; FERNANDEZ, S. Aislamiento Del vírus herpes bovino I asociado a casos de vulvovaginitis, conjuntivitis y rinitis en hatos lecheros de Costa Rica. **Ciências Veterinárias**, Heredia, v.9, n.2-3, p.105-10, 1987.

ROTH, J.A.; KAEBERLE, M.L.; GRIFFITH, R.W. Effects of BVDV on bovine polymorphonuclear leukocyte function. **American Journal of Veterinary Research**, Schamburg, v.42, p.244-50, 1981.

SANDOVAL, L.A.; ARRUDA, N.M.; TERUYA, J.M. Pesquisas em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.45, n.11-12, p.209-12, 1979.

SAW, S.P.; IBRAHIM, A.L.; OMAR, A.R. Antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle and buffaloes in Malaysia. **Veterinary Viral Diseases**, their significance in South-East Asia and the Western Pacific. Sidney, Australia, a.J. Della-Porta, p.473-5, 1985.

SELIM, S.A. et al. Indirect hemagglutination test as a mean of diagnosis of tuberculosis in Egyptian buffaloes. **Bulletin of Animal Health and Production in África**, v.26, n.4, p.315-9, 1978.

SHIPPER, I.A. et al. Mucosal disease of cattle. **Veterinary Medicine**, Lexena, v.50, p.431-4, 1955.

SILVA, L.B.G. Pesquisa de anticorpos contra RIB/VPI em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha do Marajó, Estado do Pará. **Dissertação de Mestrado**, 1996.

SILVA, M.E.T.; PEROTT, D.; PINTO, J.M. Desempenho de um sistema de produção de búfalas da raça Murrah na região nordeste PR. Londrina. **Boletim Técnico IAPR**, n.49, p.2-23, 1995.

SILVA, R.R.; MOLNAR, E.; MOLNAR, L. Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia bovina a vírus (VDBV) em bubalinos no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.256-8, 2001.

SILVA, I.; DANGOLLA, A.; KULACHELVY, K. Seroepidemiology of *Brucella abortus* infection in bovinds in Sri Lanka. **Preventive Veterinary Medicine**, v.46, p.51-9, 2000.

TRUIT, R.L.; SCHECHMEISTER, I.L. The replication of the bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in bovine leukocytes in vitro. **Archiv fuer Gesamte Virusforschung**, v.42, p.78-87, 1973.

UNIFESP – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO: **Princípios Internacionais para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais**. 2004. Disponível na internet <http://www.unifesp.br/reitoria/orgaos/comites/etica/resolucao2.htm>. Capturado em 16 Jan. 2004.

VASCONCELLOS, S.; ITO, F.H.; CORTES, J.A. Bases para a prevenção da brucelose animal. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de San Paulo**, v.11, n.1, p.25-36, 1987.

WEIBLEN, R. Doenças víricas que interferem na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.1, n.3, p.120-30, 1991.

WEIBLEN, R. Diarreia viral bovina. In: **Doença dos Bovinos de Leite Adultos**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. cap.2, p.2-23.

WEIBLEIN, R. et al. Balanopostitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brazil. **Brazilian Journal of Medicine Biological Research**, Ribeirão Preto, v.24, p.773-5, 1991.

WEIBLEN, R. et al. Balanopostitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brazil. **Brazilian Journal of Medicine Biological Research**, Ribeirão Preto, v.24, p.773-75, 1991.

ZAGHAWA, A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. **Journal-of-Veterinary-Medicine**, v.45, n.6, p.345-351, 1998.