BERNARDO AUGUSTO FRANÇA DIAS DE OLIVEIRA

Avaliação clínica e estudo da ocorrência de
broncopneumonia em bovinos

São Paulo
2015

BERNARDO AUGUSTO FRANÇA DIAS DE OLIVEIRA

**Avaliação clínica e estudo da ocorrência de broncopneumonia em
bovinos**

São Paulo
2015

BERNARDO AUGUSTO FRANÇA DIAS DE OLIVEIRA

Avaliação clínica e estudo da ocorrência de broncopneumonia em bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Lilian Gregory

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3148
FMVZ

Dias de Oliveira, Bernardo Augusto França
Avaliação clínica e estudo da ocorrência de broncopneumonia em bovinos /
Bernardo Augusto França Dias de Oliveira. -- 2015.
102 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Lilian Gregory.

1. Broncopneumonia. 2. *P. multocida*. 3. *Mollicutes*. 4. *M. dispar*. 5. BVDV. 6. VSRB.
7. BoVH. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação clínica e estudo da ocorrência de broncopneumonia", protocolado sob o nº2929/2013, utilizando 200 (duzentos) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lilian Gregory, foi aprovado em de 8/4/2015 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Clinical evaluation and study of occurrence of bronco pneumonia in bovine", protocol number 2929/2013, utilizing 200 (two hundred) bovine, under the responsibility Lilian Gregory, was approved in the meeting of day 4/8/2015 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 9 de abril de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DIAS DE OLIVEIRA, Bernardo Augusto França

Título: **Avaliação clínica e estudo da ocorrência de broncopneumonia em bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO ESSE TRABALHO À MINHA FAMÍLIA. A TODOS VOCÊS MEU ETERNO AMOR!

Ao meu pai Marcos “in memoriam”

À minha mãe querida Maria Emília

Aos meus amados Luiza e Eduardo

Aos meus irmãos Gustavo e Ana Sílvia

À minha cunhada Luciana e ao meu cunhado Guilherme

Às minhas amadas sobrinhas Beatriz e Nina

À todos meus tios, tias e primos

À minha avó Hermengarda pela destreza em construir uma família da paz

Muito obrigado. Amo todos vocês

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha esposa Luiza pelo constante incentivo em todos os momentos destes anos de amor e companheirismo.

Ao meu filho Eduardo pela alegria de ser pai.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Lilian Gregory, que confiou em mim, dedicou seu tempo me orientando e transferindo conhecimento e me abriu as portas de um novo mundo chamado “ciência”.

À todos da equipe da professora Lilian: Natália Gaeta, Bruno Mendonça, Mário Augusto, Eduardo Marques, Enoch Meira Jr, Marjorie Yumi Hasegawa e Júlia Marques pelo companheirismo e pela grande ajuda durante o desenvolvimento de todo projeto.

Agradeço também a todos os professores da FMVZ-USP e FZEA-USP pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial aos funcionários do departamento de virologia, pelo apoio nas análises.

Ao professor Dr. Edison Luiz Durigon do ICB-USP pelo apoio na análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio de projeto concedido (2012/24928-0), de extrema importância para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado concedida (Cota Institucional).

Ao professor Valdecir Marvulle, da Universidade Federal do ABC, pela grande ajuda na análise estatística.

À todos que direta ou indiretamente de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

À todos funcionários da FMVZ/USP que trabalham arduamente para manter esta instituição como referência internacional.

*“Sempre tenha em mente que sua
própria decisão de vencer é mais
importante que qualquer outra coisa”*

Abraham Lincoln

RESUMO

DIAS DE OLIVEIRA, B. A. F. **Avaliação clínica e estudo da ocorrência de broncopneumonia em bovinos.** [Clinical evaluation and study of the occurrence of bronchopneumonia in cattle]. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As doenças respiratórias são consideradas um sério problema de sanidade, causando grandes perdas econômicas devido aos altos índices de morbidade e mortalidade, sendo responsáveis por 10 a 40% das mortes em animais adultos e por 17% das mortes durante o período perinatal. O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de agentes e buscar associações entre agentes e a broncopneumonia e a associação de sinais clínicos com os agentes presentes. Foram avaliados clinicamente e os dados coletados em ficha própria 96 animais de dois rebanhos da região de Bragança Paulista e Mococa ambas no Estado de São Paulo. Sangue total e lavado traqueobrônquico instilado em haste flexível e o restante da alíquota criopreservada, foram colhidos em animais jovens e adultos, com e sem raça definida e a ocorrência dos principais agentes etiológicos virais (BVDV, VSRB e BoHV) e bacterianos (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma* sp.) causadores de broncopneumonia em bovinos foram pesquisadas. Dos cultivos bacterianos específicos, as alíquotas criopreservada apresentaram 12/96 amostras positivas para mollicutes enquanto os cultivos utilizando as hastes foram 11/96 amostras positivas para *P. multocida*. No cultivo da *P. multocida* também foram encontradas *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* sem que houvesse a ocorrência de *M. haemolytica*. PCR foi utilizada para detectar a classe mollicutes (68/96) e as espécies *M. bovis* (2/68), *M. dispar* (26/68) e *M. mycoides* subsp. *mycoides* (0/68). A técnica de vírus neutralização mostrou os seguintes resultados: 31/56 animais soronegativos para BVDV, 35/57 com BoVH e 54/58 com VSRB. Para análise estatística foi utilizado o teste do qui-quadrado em blocos ao acaso. Houve associação entre a presença de broncopneumonia em animais com BVDV ($P=0,080$) e com *P. multocida* ($P=0,076$). Animais da raça holandesa foram associados a presença de broncopneumonia ($p=0,095$). Jovens com menos de 12 meses foram associados a presença de mollicutes

($P=0,0177$). A presença de som submaciço a percussão do gradil torácico foi associado a ausência de mollicutes ($P=0,025$). A ausência de *M. dispar* foi associado a presença de sibilo ($P=0,076$) e de estertor úmido ($P=0,046$) na ausculta pulmonar. Houve uma chance maior de 5,5 vezes de apresentar tosse na presença de *P. multocida* enquanto na sua ausência há uma maior chance dos animais apresentarem secreção mucosa (7,3) e mucopurulento (5,8), som submaciço (9,6), crepitação fina (13) e estertor úmido (5). Houve associação entre a ausência de *M. bovis* e a presença de som claro a percussão do gradil torácico dos bovinos examinados.

Palavras-chave: Broncopneumonia. *P. multocida*. *Mollicutes*. *M. dispar*. BVDV. VSRB. BoVH.

ABSTRACT

DIAS DE OLIVEIRA B. A. F. **Clinical evaluation and study of the occurrence of bronchopneumonia in cattle.** [Avaliação clínica e estudo da ocorrência de broncopneumonia em bovinos]. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Respiratory diseases are considered a serious problem of sanity, causing huge economic losses due to high rates of morbidity and mortality, accounting for 10-40% of deaths in adults and 17% of deaths during the perinatal period. The objective of this study was to determine the occurrence of agents and seek associations between agents and bronchopneumonia and the association of clinical signs with these agents. They were evaluated clinically and data collected in own record 96 animals of two herds of Bragança Paulista region and Mococa both in São Paulo. Whole blood and washed tracheobronchial were harvested in young and adult animals, Holstein and undefined breed and the occurrence of major viral etiologic agents (BVDV, BRSV and BoHV) and bacterial (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma* sp.) causing bronchopneumonia in cattle were surveyed. The specific bacterial cultures showed positive samples *Mollicutes* 12/96 and 11/96 samples positive for *P. multocida*. In the cultivation of *P. multocida* were also found *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and there was no occurrence of *M. haemolytica*. PCR was used to detect the class *Mollicutes* (68/96) and the species *M. bovis* (2/68), *M. dispar* (26/68) and *M. mycoides* subsp. *mycoides* (0/68). The virus neutralization technique showed the following results: 31/56 animals BVDV positive, 35/57 and 54/58 with BoVH with BRSV. Statistical analysis was performed using the chi-square test in blocks. There is an association between bronchopneumonia in animals and the presence of BVDV ($p = 0.080$) and *P. multocida* ($P = 0.076$). Holstein animals were associated with the presence of bronchopneumonia ($p = 0.095$). Calves under 12 months were associated with the presence of *Mollicutes* ($P = 0.0177$). The sound submassive present during percussion of the thoracic cage was associated with the absence of *Mollicutes* ($P = 0.025$). The absence of *M. dispar* was associated with presence of wheezing ($P = 0.076$) and wet rattle ($P = 0.046$) in lung auscultation. There was a greater chance of 5.5 times to present cough in the presence of *P.*

multocida as in its absence there is a greater chance of the animals show mucous secretion (7.3) and mucopurulent (5.8), submassive sound (9.6), thin crackling (13) and wet rattle (5). There was an association between the absence of *M. bovis* and the presence of clear sound of chest cage percussion of the examined cattle.

Keywords: Bronchopneumonia. *P. multocida*. *Mollicutes*. *M. dispar*. BVDV. VSRB. BoVH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ficha clínica utilizada no estudo.....	58
Figura 2 - Animal contido pronto para ser acessado para obtenção do lavado ..	60
Figura 3 - Lavado Traqueobrônquico obtido após os procedimentos	60
Figura 4 - Colônia de micoplasma com sua forma característica de “ovo frito” ..	70
Figura 5 - Análise PCR para classe <i>mollicutes</i> . Amostras 1, 4, 6, 7, 11 e 12 positivas e amostra 14 como controle	71
Figura 6 - Resultado da PCR para <i>M. dispar</i> . Amostras positivas nos números 1, 2, 4, 8, 9 e 10 sendo o número 15 o controle	72
Figura 7 - Resultado <i>M. bovis</i> na análise de PCR	72
Figura 8 - Resultado negativo para <i>M. mycoides</i> subsp <i>mycoides</i> , ficando somente o controle (13) marcado.....	73
 Quadro 1 - Sequências de oligonucleotídeos específicos para <i>Mollicutes</i> e tamanho do produto amplificado	63
Quadro 2 - Primer específicos para <i>M. dispar</i> e tamanho do produto amplificado	63
Quadro 3 - Primer específicos para <i>M. bovis</i> e tamanho da amplificação.....	64
Quadro 4 - Primer específicos para <i>M. mycoides</i> subsp <i>mycoides</i> e tamanho amplificado	65
 Gráfico 1 - Bactérias encontradas durante cultivo e isolamento de <i>Pasteurella</i> <i>spp.</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Associação entre a saúde dos animais e a presença de <i>Mollicutes</i> , <i>M. díspar</i> , <i>M bovis</i> , <i>P. multocida</i> , BoVH, BVDV e VSRB em lavado traqueo-brônquico - São Paulo - 2015	75
Tabela 2 -	Associação da broncopneumonia com as variáveis idade e raça - São Paulo – 2015.....	76
Tabela 3 -	Associação entre a idade dos animais e a presença de <i>Mollicutes</i> no lavado traqueobrônquico de bovinos examinados - São Paulo - 2015	76
Tabela 4 -	Associação entre a presença de <i>Mollicutes</i> e o som submáximo à percussão do gradil torácico dos bovinos examinados - São Paulo - 2015.....	77
Tabela 5 -	Associação entre alterações na ausculta pulmonar e a presença <i>M. díspar</i> no lavado traqueobrônquico - São Paulo - 2015	77
Tabela 6 -	Associação entre a presença de <i>Pasteurella multocida</i> e diferentes manifestações nos bovinos examinados - São Paulo – 2015	78
Tabela 7 -	Associação entre a ausência de <i>M. bovis</i> e a presença de som claro a percussão do gradil torácico dos bovinos examinados - São Paulo - 2015	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	- Monofosfato Cíclico de Adenosina
BVDV	- Vírus da Diarreia Viral Bovina (do inglês Bovine Viral Diarrhea Virus)
BoHV-1	- Herpes Vírus Bovino tipo 1 (do inglês Bovine herpes virus type 1)
BHI	- Brain and heart infusion broth
CBT	- Contagem Bacteriana Total
CDRB	- Complexo de Doenças Respiratórias dos Bovinos
DNA	- ácido desoxirribonucleico
dNTP	- deoxiribonucleotídeos
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	- Estados Unidos da América
FMVZ	- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FTIP	- Falha na Transferência de Imunidade Passiva
GMPc	- Monofosfato Cíclico de Guanosina
IBR	- Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IgA	- Imunoglobulina A
IgG	- Imunoglobulina G
IL-8	- Interleucina 8
IM	- Intramuscular
LPE	- Livre de Patógenos Específicos
LPS	- Lipopolissacarídeo
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
MP	- Mannheimiose Pneumônica

NAHMS	- National Animal Health Monitoring System
PBS	- Phosphate Buffered Saline
PCB	- Pleuropneumonia Contagiosa Bovina
PCR	- polimerase chain reaction
PEB	- Pneumonia Enzoótica dos Bezerros
PI-3	- Vírus da Parainfluenza tipo 3
RNA	- ácido ribonucleico
rRNA	- ácido ribonucleico ribossomal
rpm	- rotações por minuto
SC	- Small Colony
USP	- Unversidade de São Paulo
VN	- Vírusneutralização
VSRH	- Vírus Sincicial Respiratório Humano
VSRB	- Vírus Sincicial Respiratório Bovino

LISTA DE SÍMBOLOS

G	- Gauge
g	- unidade de aceleração da gravidade
g	- gramas
°C	- grau celsius
µm	- micrometro
µl	- microlitro
“	- polegadas
Mg/Kg	- miligrama por quilograma
mL	- mililitro
MR/min.	- Movimentos respiratórios por minuto
%	- porcentagem
U/mL	- Unidades por mililitro
UFC/mL	- Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
US\$	- Dólar dos Estados Unidos (do inglês United State Dollar)
USDA	- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês United States Department of Agriculture)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	ETIOLOGIA	22
2.1.1	<i>Mycoplasma spp.</i>	23
2.1.2	Parainfluenza-3 (PI-3)	23
2.1.3	Vírus Sincicial Respiratório Bovino	24
2.1.4	Herpes Vírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)	24
2.1.5	Diarreia Viral Bovina (BVDV)	25
2.1.6	Mannheimia haemolytica e Pasteurela multocida	25
2.2	EPIDEMIOLOGIA	26
2.2.1	<i>Mycoplasma sp.</i>	26
2.2.2	Parainfluenza-3 (PI-3)	28
2.2.3	Vírus Sincicial Respiratório Bovino (VSRB)	30
2.2.4	Herpes Vírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)	31
2.2.5	Diarréia Viral Bovina (BVDV)	33
2.2.6	Mannheimia haemolytica e Pasteurela multocida	34
2.3	FATORES DE RISCO	36
2.4	PATOGENESE	39
2.4.1	Mecanismos de defesa pulmonar	39
2.4.2	Desenvolvimento da pneumonia	42
2.4.3	Evasão dos patógenos ao sistema imune	45
2.5	SINAIS CLÍNICOS	46
2.6	TRATAMENTO	51
2.7	PREVENÇÃO	53
2.8	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	59
3.2	COLETA DO MATERIAL	59
3.3	EXTRAÇÃO DO DNA	61
3.4	CULTIVO E ISOLAMENTO DE MICOPLASMA	61
3.5	IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMA POR PCR	62

3.5.1	PCR da classe <i>mollicutes</i>	62
3.5.2	PCR específico para <i>M. dispar</i>	63
3.5.3	PCR específico para <i>M. bovis</i>	64
3.5.4	PCR específico para <i>M. mycoides subsp mycoides</i>	64
3.5.5	Deteção da amostra amplificada	65
3.6	VÍRUS NEUTRALIZAÇÃO (VN) PARA BVDV, BoHV-1 E VSRB	65
3.6.1	VN para BVDV	65
3.6.2	VN para BoHV-1	66
3.6.3	VN para VSRB	67
3.7	CULTIVO E ISOLAMENTO DE <i>P. multocida</i> e <i>M. haemolytica</i>	68
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
4	RESULTADOS	70
4.1	ESTATÍSTICA DESCRITIVA	70
4.1.1	Cultivo e isolamento de <i>Mycoplasma sp</i>	70
4.2.1	Identificação de <i>Mycoplasma sp</i> por PCR	71
4.2.1.1	PCR da classe Mollicutes	71
4.2.1.2	PCR específico para <i>M. dispar</i>	71
4.2.1.3	PCR específico para <i>M. bovis</i>	72
4.2.1.4	PCR específico para <i>M. mycoides subsp. mycoides</i>	73
4.3.1	Vírus Neutralização (VN) para BVDV, BoHV-1 e VSRB	73
4.3.1.1	VN para BVDV	73
4.3.1.2	VN para BoVH-1	74
4.3.1.3	VN para VSRB.....	74
4.4.1	Cultivo e isolamento de <i>P. multocida</i> e <i>M. haemolytica</i>	74
4.5	ESTATÍSTICA ANALÍTICA	75
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

O sistema respiratório é capaz de desenvolver diversas funções no organismo animal. A mais importante, é relacionada às trocas gasosas em que são realizadas, a oxigenação do sangue e a liberação de gás carbônico nos alvéolos pulmonares. Para ocorrer a hematose, o ar inalado deve se aproximar da barreira alvéolo-capilar. Outros exemplos de funções do sistema respiratório são a manutenção do equilíbrio ácido-base. Atua, ainda, na termorregulação dos animais e também na fonação (GONÇALVES, 2004).

Dentre os diversos fatores responsáveis pela baixa produtividade do rebanho bovino, as pneumonias se encontram em situação de destaque, principalmente pelo alto índice de morbidade entre os animais (FARSHID et al., 2002; SNOWDER et al., 2006). A constante exposição do sistema respiratório aos microrganismos potencialmente patogênicos, à agentes físicos e químicos bem como as particularidades anatômicas de trato respiratório dos bovinos predispõe esta espécie às doenças inflamatórias pulmonares (MOSIER, 1997; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

As doenças respiratórias são consideradas um grave problema de sanidade, levando a prejuízos de ordem econômica devido aos altos índices de morbidade (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002) e mortalidade, sendo responsáveis por 10 a 40% das mortes nos animais adultos (VIEIRA et al., 1993) e por 17% das mortes durante o período perinatal (ROOK et al., 1990).

As pneumonias são mais frequentes, principalmente em animais jovens (AMES, 1997; HARTEL et al., 2004). Os episódios da doença, em geral, ocorrem até os dois anos de vida, sendo a maioria até o desmame (CROWE, 2001). Por ser a pneumonia uma das principais causas de perdas econômicas na cadeia produtiva bovina, a gestão sanitária dos rebanhos deve priorizar a promoção da saúde dos animais desde seu nascimento, minimizando falha na transferência de imunidade passiva e otimizando a cura de umbigo.

Nos bovinos em particular, as pneumonias de maior importância são as pneumonias intersticiais, que compreendem as afecções de natureza não infecciosa causada pela inalação de toxinas e alérgenos e as broncopneumonias, que possuem na sua etiologia agente virais e bacterianos (ANDREWS et al., 1992;

RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002), sendo esta última responsável por 80% dos casos da doença tendo a maior importância econômica (ANDREWS et al., 1992; REBHUN, 2000).

No gado em geral, *M. haemolytica*, *P. multocida* e *Mycoplasma* spp. estão entre os patógenos primários e provavelmente como fatores etiológicos das doenças respiratórias. A *M. haemolytica*, em muitos casos, coloniza o trato respiratório anterior de animais saudáveis, em relação de comensalismo. No entanto, pode também invadir o trato respiratório posterior em uma falha na defesa do hospedeiro, causando dessa forma a pasteurelose pneumônica (JONG et al., 2014).

Estas bactérias possuem grande importância na etiologia, estão frequentemente associados a vírus durante a infecção (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; GRIFFIN et al., 2010; JONG et al., 2014) quando se utilizam de fatores virais como leucotoxinas, lipossacarídeos, adesinas e outras proteínas de membrana, para atacar células de defesa do hospedeiro e assim facilitar sua colonização (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

Os principais agentes virais são: vírus da diarreia bovina (BVDV), herpes vírus bovinos (BoHV-1), vírus respiratório sincicial bovino (VSRB) e vírus da parainfluenza (PI-3). O PI-3 é normalmente o vírus mais isolado em bezerros acometidos. O VSRB acomete geralmente tanto os bezerros de corte como os de leite, mas principalmente bezerros de leite até 6 meses de idade. Já o BVDV e o BoHV-1 associado a rinotraqueíte bovina, também representam parte significativa no acometimento respiratório de bezerros (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Porém, até o momento, grande parte dos estudos relata o panorama europeu e da América do Norte, onde este grupo de agentes são descritos dentro de um problema maior denominado Complexo de Doenças Respiratórias Bovinas (CDRB) onde são mais comumente relatadas a pneumonia enzoótica bovina (PEB) e a febre do transporte (shipping fever), representando grande parte do prejuízo econômico dentro da cadeia pecuária leiteira e de corte. Na América Latina assim como em diversos outros países, a broncopneumonia ainda é pouco estudada devido a dificuldade de se promover um estudo onde ampla gama de fatores externos e agentes causadores estejam envolvidos no desenvolvimento desta doença. No Brasil, existem estudos da ocorrência de *P. multocida* e *M. haemolytica* em ovinos (VIANA et al., 2007). Em bezerros no primeiro mês de vida, por meio de lavado

traqueobronqueal, é relatado em estudo recente a presença de *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. e *Escherichia coli* na mesma proporção em bezerros clinicamente saudáveis e com broncopneumonia (BENESI et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foram pesquisar quais agentes estão envolvidos na ocorrência de broncopneumonia nas propriedades estudadas, se há algum sinal clínico associado a ocorrência de um ou mais agentes e se outras características como raça e idade são associados a ocorrência de um ou mais agentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

Pneumonia é a inflamação do parênquima pulmonar, normalmente acompanhada por inflamação dos bronquíolos o que caracteriza a broncopneumonia. Pleurisia está quase sempre presente nos animais acometidos. A pneumonia pode ser causada por vírus, bactérias ou por ambos microrganismos, e também por fungos, parasitas e agentes físicos e químicos. A maior parte das pneumonias tem origem nos brônquios, porém podem ocorrer também por via hematogênica (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Nos bovinos a pneumonia pode ocorrer com diferentes formas e agentes etiológicos o que caracteriza a formação de um complexo de doenças respiratórias de bezerros (CDRB). Febre dos transportes ou Manheimiose pneumônica (MP) causada por *M. haemolytica*, *P. multocida* com ou sem VSRB, pneumonia enzoótica dos bezerros (PEB) causada por PI-3, VSRB, BOHV-1, *Mycoplasma*, *Pasteurella* spp., dentre outras bactérias como *Chlamydia*, *Truperela pyogenes*, *Streptococcus* sp, *Bedsonia* sp, *Actinobacillus actinoides* e *Haemophilus sommus*, pleuropneumonia contagiosa bovina (PCB) causada por *Mycoplasma mycoides*, pneumonia intersticial virótica causada por VSRB, pneumonia associada a mastite causada por *Klesbsiella pneumoniae*, pneumonia por verme pulmonar causada por *Dictyocaulus viviparus* (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Em rebanhos leiteiros, as broncopneumonias do CDRB podem ocorrer na forma de surtos ou como endemias. A doença na forma crônica e endêmica, conhecida por PEB, possui alta frequência em sistema intensivos de criação. Já em rebanhos de corte, principalmente nos Estados Unidos e Comunidade Européia, a febre dos transportes ou manheimiose pneumônica apresenta alta ocorrência na forma de surtos em animais estressados por desmama recente ou mesmo pelo transporte para instalações de confinamento. Desta forma fatores de risco ambientais e de hospedeiros contribuem para patogênese, gravidade e natureza da broncopneumonia (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

2.1.1 *Mycoplasma spp.*

Habitantes típicos das mucosas respiratória, urogenital, trato gastrointestinal, olhos e glândulas mamárias, os micoplasmas possuem uma relação individual com seus hospedeiros, considerados patógenos primários ou oportunistas sendo o fator etiológico mais importantes e mais comum na broncopneumonia de bezerros (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; MAUNSELL; DONOVAN, 2009). Várias espécies de micoplasmas são isolados de amostras provenientes de swabs, lavados traqueobrônquicos e partes do pulmão. *Mycoplasma dispar*, *M. mycoides subsp. mycoides small colony* (SC), *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *M. bovigenitalium*, *M. arginini*, *M. canis* e *Ureaplasma spp.* estão presentes em vários relatos.

2.1.2 Parainfluenza-3 (PI-3)

O vírus Parainfluenza bovino tipo 3 (PI-3) é membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Paramyxovirus* (GONÇALVES et al., 2003). O PI-3 é um agente etiológico primário da pneumonia baseado no seu isolamento, ocorrência de lesões características e em infecções experimentais. Este vírus é isolado mais comumente em bezerros acometidos e a sua inoculação em bezerros que não tiveram acesso ao colostro produziram a doença em uma forma muito similar a infecção natural (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). Em terneiros infectados experimentalmente a maioria dos animais apresentou sinais clínico brandos se recuperando em poucos dias. Entretanto, a infecção pode resultar em pneumonia intersticial, afetando geralmente os lobos pulmonares anteriores (GONÇALVES et al., 2003).

2.1.3 Vírus Sincicial Respiratório Bovino

Pertencente ao gênero *pneumovirus*, ele é um membro da família Paramyxovirus. O VSRB provoca pneumonia tanto em bezerros de corte como em bezerros de leite, em todas as idades, mas principalmente em bezerros leiteiros com menos de 6 meses de idade. O sorotipo do vírus isolado em animais difere antigenicamente do vírus sincicial respiratório humano (VSRH). Surtos do VSRB com infecção secundária por *P. multocida*, *S. pneumoniae* e *M. bovis* são descritos desde a década de 80 sendo este um dos agentes responsáveis por grandes perdas econômicas na bovinocultura mundial (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

2.1.4 Herpes Vírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)

O BoHV-1 pertence a família *herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesviridae* gênero *varicellovirus*. Possui partículas entre 70 a 110 nm de diâmetro sendo constituído por capsídio icosaédrico, envelope glicoproteico e genoma linear de dupla fita (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; KUNRATH et al., 2004). A família do herpesvírus é onipresente no reino animal e provavelmente cada espécie de mamíferos, pássaros, pequenos vertebrados e alguns invertebrados abrigam um ou mais tipos de herpesvírus e que ao menos 40 espécies fazem parte desta família (YATES, 1982).

Uma característica importante deste vírus é a sua capacidade de manter-se em latência nos gânglios de nervos sensoriais, principalmente trigêmeo e sacral (BEZERRA et al., 2012). Mediante fatores estressantes que diminuam a resistência imunológica do hospedeiro, o vírus poderá ser reexcretado principalmente pela ação da proteína timidina kinase, assegurando desta forma a permanência do vírus no rebanho (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; JONES; CHOWDHURY, 2008). Seu ciclo de crescimento é relativamente curto, com a sua replicação se completando dentro de 12 horas (YATES, 1982).

2.1.5 Diarreia Viral Bovina (BVDV)

A diarreia viral bovina (BVDV) é uma enfermidade dos ruminantes que causa grande prejuízo econômico nos rebanhos. Com uma distribuição geográfica cosmopolita ela está presente em grande parte do rebanho mundial. Esta doença é causada por um RNA vírus, membro do gênero *Pestivirus* e da família *Flaviridae*, juntamente com o vírus da peste suína e o vírus da doença das fronteiras ou “border disease”. Apresenta 2 biotipos sendo um não citopatogênico e o outro citopatogênico resultante de uma mutação do vírus não patogênico. No caso de uma infecção fetal pelo tipo não patogênico até os 120 dias de gestação, pode resultar na geração de um animal persistentemente infectado (PI), que é o principal fator de disseminação da doença (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Embora a maior parte das infecções serem brandas e agudas e que não sejam diagnosticadas, elas desencadeiam um efeito imunossupressor aumentando com isso a patogenicidade de outros microrganismos como BoHV-1, VSRB e *P. haemolytica* (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

2.1.6 *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurela multocida*

A pasteurelose pneumônica é uma doença muito comum em bezerros jovens de corte nos países europeus e da América do Norte podendo também ocorrer em animais adultos de corte e leite. Esta doença também é conhecida como febre dos transportes e faz parte do CDRB que se caracteriza por uma broncopneumonia aguda com toxemia (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

M. haemolytica, seu principal agente, compreende de 12 sorotipos (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 e A17) originalmente atribuída a *P. multocida*. A *M. haemolytica* biótipo A sorotipo 1 é a causa mais comum da pneumonia e a *P. multocida* é isolada ocasionalmente. *M. haemolytica* é a principal bactéria encontrada em confinamentos do EUA sendo um componente importante da pneumonia enzoótica em bezerros neonatos (RICE et al., 2008; JARAMILLO-ARANGO et al., 2009).

Hospedeiro comensal da nasofaringe, *M. haemolytica* ganha acesso aos pulmões de forma oportunista quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas por estresse ou infecções respiratórias por viroses ou micoplasmas (RICE et al., 2008). Desta forma, *Pasteurella sp* são a causa final da pneumonia, mas os mecanismos pelos quais conseguem penetrar e colonizar o pulmão causando lesões, ainda são complexos e incertos. Vírus e micoplasmas podem atuar de maneira sinérgica para permitir que a bactéria seja patogênica. Porém, é frequente situações de estresse como transporte, introdução de novos animais ao rebanho, confinamento e ventilação e alojamentos ineficientes acompanhando o surgimento da doença (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

2.2.1 *Mycoplasma sp*

Várias espécies de micoplasmas foram isolados de ruminantes na Grã Bretanha entre 1990 e 2000. O *M. bovirhinis* foi o microrganismo mais comumente isolado apresentando uma prevalência de 28% e o *M. bovis* com 22% das 8959 amostras analisadas (AYLING et al., 2011). A soroprevalência de infecções de *M. bovis* em todos os estados da França foi pesquisada em 824 rebanhos de corte e um total de 32197 bezerros em aleitamento de até um ano de idade. Uma média de 60% dos rebanhos apresentou animais positivos mas com uma pequena porcentagem de 7% dos animais positivos (LE GRAND et al., 2002). Ainda na França, Arcangioli et al. (2008) analisaram 135 bezerros de 9 confinamentos durante ocorrência natural de surtos de doenças respiratórias. O *M. bovis* foi isolado em 8 dos 9 rebanhos e em 106 das 135 amostras analisadas. Em rebanhos leiteiros, Valacher e Hagglund (2006) relatou uma pesquisa de soroprevalência dos principais agentes de CDRB. Nos 78 animais analisados 10,3% dos bezerros e 7,7% das vacas apresentaram anticorpos para *M. bovis*. Nos lavados bronco-alveolares foram encontrados *M. bovis* em 8 (89%) dos 9 rebanhos e de 106 (78,5%) dos 135 animais testados. Durante 1986 e 1991 na Holanda o *M. bovis* foi isolado de lavados

traqueais em 36 bezerros com problemas respiratórios de 7 rebanhos de corte (TER LAAK; WENTINK; ZIMMER, 1992). Pardon et al. (2011) determinaram a prevalência de patógenos respiratórios em 24 surtos que ocorreram em 15 rebanhos da Bélgica. O *M. bovis* foi obtido em amostras pareadas de soro com 75% dos bezerros e 84,6% dos rebanhos examinados positivos. Na Dinamarca, Kusiluka et al. (2000) relataram 86% de prevalência de micoplasmas onde o *Ureaplasma* spp. foi predominante em 72% das amostras seguido pelo *M. dispar* (48%), *M. bovis* (24%), *M. bovirhinis* (20%) e *M. bovigenitalium* (6%). Infecções múltiplas foram mais predominantes (76,6%) em relação a infecções simples (23,3%). O *M. bovis* teve um aumento considerável em relação a resultados anteriores nos sinalizando que esta espécie de micoplasma talvez deva ter uma atenção especial. Nicholas (2004) relatou que na Irlanda em 1994 o *M. bovis* foi isolado de 13 a 23% de pulmões pneumônicos. Na França o *M. bovis* foi isolado de 30% de rebanhos com pneumonia e que na Bretanha de 20 a 25% dos rebanhos com pneumonia possuem anticorpos para *M. bovis*. Hotchkiss, Dagleish e Willoughby (2010) relataram na Escócia uma prevalência de 9,4% de amostras positivas para micoplasma e em 36,7% dos rebanhos em um estudo envolvendo a pesquisa de diversos patógenos respiratórios. Em 18 rebanhos na Finlândia, sendo 10 unidades de aleitamento (de 48 a 217 cabeças) e 8 produtoras de leite (de 30 a 130 cabeças), foram colhidas amostras de sangue e de lavado traqueal em 84 bezerros para pesquisa sorológica viral e cultura bacteriana. O *M. dispar* foi detectado em 90,5% dos bezerros enquanto outras espécies de micoplasmas estavam presente em 60,7% (NIKUNEN et al., 2007).

O *M. bovis* aparenta ser difundido nos Estados Unidos segundo a National Animal Health Monitoring System (NAHMS) em pesquisa realizada em 2002, 7,9% das 871 fazendas testaram positivo para micoplasmas em uma única amostra de leite do tanque e o *M. bovis* estava presente em 86% das amostras positivas. Fulton et al. (2009) relataram uma prevalência de 80% nas propriedades leiteiras e em 19% dos animais. O *M. bovirhinis* foi o agente mais isolado tendo uma menor frequência o *M. bovis* e o *M. arginini*. Neste mesmo ano, os pesquisadores da universidade de Kansas, Yeary e Nietfeld (2002), relataram o isolamento de espécies de micoplasma em 85% das 185 amostras de pulmão analisadas. Dos 81 micoplasmas isolados e identificados quanto a espécie, 68 (83,9%) foram de *M. bovis*, tiveram 6 detectados de *M. arginini*, 1 detectado para *M. alkalescence*, *M. bovirhinis*, *M. canadense* e 4 não

tiveram identificação após ensaio de PCR. Para determinar a prevalência de espécies de mollicutes e *M. bovis*, White et al. (2010) realizaram cultura de swab nasal e teste de PCR em bezerros de corte recém transportados. Na chegada, 22 dos 291 (7,6%) bezerros foram positivos em culturas de swab nasal para espécies de *Mollicutes*. Dos animais que apresentaram problemas respiratórios após a chegada, amostras foram colhidas antes do início do tratamento onde 34 de 130 (26,2%) foram positivos para *Mollicutes* e 7 dos 34 positivos (20,6%) tiveram resultado positivo para *M. bovis* no teste de PCR. Em um estudo retrospectivo de casos de broncopneumonia entre os anos 1995 a 1998 diagnosticados em confinamentos no Canadá, Shahriar et al. (2002) relataram que o antígeno para *M. bovis* se apresentou positivo em 91% dos casos. Já em um estudo prospectivo realizado em 1999, 94% dos animais acometidos por broncopneumonia apresentaram antígeno de *M. bovis*.

Ghoneim et al. (2010) em seu trabalho no Egito recuperaram de swabs nasais *Mycoplasma* spp. em 46,67% dos bezerros pneumônicos enquanto a taxa nos animais sadios se apresentou em 32%. O *M. bovis* foi o de maior prevalência seguido pelo *M. díspar*. As infecções mistas prevaleceram em 12% das amostras, índice tido como relativamente alto. Associações de BVDV com *Mycoplasma* sp e também *M. haemolytica* com *Mycoplasma* sp apresentaram 9,33% e 8% respectivamente.

2.2.2 Parainfluenza-3 (PI-3)

Seu primeiro isolamento foi nos EUA a partir de secreções nasais de bovinos com manifestações clínicas de febre dos transportes (GONÇALVES et al., 2003). Em rebanhos da América do Norte mais especificamente no Canadá, Durham e Hassard (1990) relataram uma prevalência de 93,9% do total de 1745 soros analisados e em 99,7% das 295 propriedades que participaram do estudo.

Valacher e Hagglund (2006) determinaram soroprevalência de parainfluenza-3 (PI-3) de 100% nas vacas e 97,5% dos bezerros de um total de 78 animais testados no sudoeste da França. Na região sudoeste da Suécia, 118 rebanhos

leiteiros foram estudados. Do total de amostras, 48% apresentaram-se soropositivos para PI-3 (HAGGLUNG et al., 2006). Ainda em 2006, Hagglund et al. pesquisaram 78 bezerros e suas mães em 20 fazendas de corte situadas no sudoeste da França, procurando anticorpos contra diversos agentes causadores de problemas respiratórios incluindo o PI-3. 97,5% dos bezerros e 100% das mães apresentaram anticorpos.

Yesilbag e Gungor (2008) descreveram a distribuição sorológica dos vírus respiratórios mais importantes em animais não vacinados na região de Marmara, noroeste da Turquia. Entre 584 amostras coletadas em 34 rebanhos de 7 províncias, 43% foram positivos para PI-3

Suzan et al. (1983) realizaram amplo estudo da prevalência de diversos vírus, entre eles o PI-3, em rebanhos de leite e corte no México. Nos rebanhos leiteiros eles obtiveram taxa de 75% sororeagentes enquanto nos rebanhos de corte esta taxa ficou em 69,3% de sororeagentes. Solís-Calderón et al. (2007) pesquisaram a presença de anticorpos em 728 amostras provenientes de 52 rebanhos do estado de Yucatan no México. Eles obtiveram média de 85,6% dos animais positivos para PI-3 sendo que cada fazenda apresentou pelo menos 5 animais com a presença de anticorpos.

No Brasil, Candeias e Ribeiro (1968) relataram a ocorrência da infecção através da detecção de anticorpos utilizando uma cepa viral humana. Dois anos mais tarde, utilizando já amostras de origem bovina obtiveram 84,1% de positivos em 902 amostras de soro provenientes dos estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul, Wizigmann et al. (1972) constataram 97% de reagentes positivos em 221 amostras de soro. Dal Pizzol et al. (1989) detectaram 70% de amostras positivas entre 393 analisadas e 34% positivas em 205 amostras de soro ovino testadas (apud GONÇALVES et al., 2003). Em 2003 foi relatado a presença deste vírus em 1 (um) bovino de 1 mês de idade que apresentou sinais clínicos pertencente a um criatório do Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 2003).

2.2.3 Vírus Sincicial Respiratório Bovino (VSRB)

Foi identificado pela primeira vez em 1967 na Suíça e posteriormente em 1970 no Japão (DRIEMEIER et al., 1997). Pouco mais tarde em 1974, foi identificado nos EUA sendo relatado no estado de Iowa a presença do vírus em 81% de 43 rebanhos estudados (BRODERSEN, 2010). Elazhary et al. (1980) pesquisaram a presença de anticorpos em 1.444 bovinos encontrando uma prevalência média de 35,9% que variou entre 53% a mais alta e 21,8% a mais baixa. Durante um surto que afetou 77 animais em uma fazenda, o VSRB foi associado a presença de IBR, BVDV, PI-3 e Adenovirus tipo 3 detectados por soroconversão. Elvander (1996) analisou em seu estudo na Suécia a prevalência de VSRB em 2.237 amostras de leite provenientes de tanques de resfriamento observando uma alta prevalência que variou de 41 a 89%. Também foi observada uma alta correlação entre a prevalência do vírus e a densidade do rebanho visto que em 69% do rebanho nacional a prevalência do vírus foi de 71% ou superior. Paton et al. (1998) relatou uma prevalência de 100% dos 341 rebanhos pesquisados por amostras do tanque de leite. O VSRB tem papel claro de destaque nas doenças respiratórias se apresentando sozinho ou associado. Na França Valacher e Hagglund (2006) relataram uma soroprevalência em 78 animais de 89,7% nos jovens e 93,6% nos adultos.

No Brasil, Gonçalves et al. (2003) realizaram o primeiro registro do vírus isolando-o de pulmões procedentes de frigorífico. A primeira descrição da doença natural em bovinos de corte criados extensivamente foi feita no Rio Grande do Sul por Driemeier et al. (1997). No ano 2000, Peixoto et al. relataram um surto de VSRB ocorrido em 2 fazendas no estado de Alagoas que haviam importado animais das raças Pardo Suíça e Holandesa na qual morreram pelo menos 220 cabeças entre 1995 a 2000. Em estudo recente no estado de São Paulo, Affonso et al. (2012), observaram prevalência média de 63% variando de 45,6% a 84,4% nas 3 propriedades leiteiras de criação intensiva da raça Holandesa incluídas no estudo.

2.2.4 Herpes Vírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)

O Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) encontra-se mundialmente disseminado, com diferentes prevalências e incidências. Este vírus foi erradicado da Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Suíça e Noruega bem como do estado da Bavária na Alemanha e na província de Bolzano na Itália (RAAPERI et al., 2014).

Em uma revisão de literatura, pesquisadores americanos relataram soroprevalência do BoHV-1 entre 14 e 60% na África e de 36 a 48% nas Américas central e do sul. Na Holanda 49% das vacas que dão à luz seu primeiro bezerro são sororeagentes, enquanto 91% das vacas mais velhas são sororeagentes (JONES; CHOWDHURY, 2008). A soroprevalência deste vírus em bisões nos EUA foi relatada em 43,8%, indicando que esta infecção pode ocorrer nesta espécie.

A prevalência de BoHV-1 em rebanhos leiteiros da Estônia foi determinado em 22% em um estudo conduzido em 103 propriedades rurais coletando uma amostra do tanque de leite e mais de 20 animais de diferentes idades em cada fazenda. 63,5% dos animais jovens dos rebanhos infectados testaram positivo (RAAPERI, 2012). Na Inglaterra e País de Gales 341 rebanhos leiteiros tiveram 69,2% de prevalência, número este superior aos dos últimos 20 anos (PATON et al., 1998). Boelaert et al. (2000) demonstraram que em 556 rebanhos da Bélgica 67% eram positivos ao passo que 35,9% dos 28.478 foram sororeagentes em fazendas de leite e carne. Rinaldi et al. (2007) analisaram 81 rebanhos e 948 animais no sul da Itália, obtendo taxas de 98,8% e 77,5% respectivamente de sororeagentes. Woobdine et al. (2009) relataram prevalência similar de 43,1% e 42,5% no sudoeste inglês para rebanhos e animais positivos. Já na Escócia em 1981, Msolla, Wiseman e Selman observaram que rebanhos de corte tinham prevalência muito maior que os de leite (82% e 48%) e uma baixa incidência nos animais que ficou em 12% na média geral. Dois trabalhos na Espanha relataram bem a situação de 2 regiões distintas. Eiras et al. (2009) analisaram todos os rebanhos da região da Galícia encontrando 50,4% de rebanhos com 38,4% dos animais positivos. Porém na Andaluzia, Gonzalez-Garcia et al. (2009) coletaram em 164 rebanhos 2393 amostras sendo que 70,4% dos rebanhos e 45,7% dos animais testaram positivos. Cowley et al. (2011) em trabalho na Irlanda verificaram que de 1175 rebanhos 77,4% foram

sororeagentes. Tekes et al. (1999) demonstraram que o tamanho do rebanho é um fator que influencia a prevalência. De 64.104 rebanhos leiteiros pesquisados na Hungria (736 grande e 63.373) 79,3% dos grandes rebanhos e 13,5% dos pequenos rebanhos foram sororeagentes. Em outro trabalho de grandes proporções, Van Wuijckhuise et al. (1998) observaram 84% de prevalência em 33.636 rebanhos holandeses. Castrucci et al. (1997) observaram em 51 rebanhos leiteiros do norte da Itália que 84% foram positivos e que 35 % dos 6.415 animais reagiram ao teste sorológico. Na França em 78 animais pesquisados por Valacher e Hagglund (2006) encontrou-se uma ocorrência de 16,6% tanto em animais adultos quanto jovens.

Na região central do Irã, Shirvani et al. (2012) pesquisaram 5 vírus comumente encontrados em desordens respiratórias. Para o BoHV-1 foi determinado uma prevalência de 72% dos 642 soros proveniente de vacas em lactação analisados.

Por toda América do Sul a incidência do BoHV-1 é alta. No Uruguai, Guarino et al. (2007) determinaram anticorpos contra BoHV-1 prevalentes no soro de 6.358 amostras bovinas (novilhas, vacas e touros) colhidas entre 2000 e 2001. Dos 230 rebanhos de corte analisados 99% eram positivos com uma prevalência de 37% dos animais estudados. A situação neste país foi comparada à encontrada por Obando et al. (1999) na Venezuela que era de 36%. Em rebanho de leite e misto (corte e leite) no Equador, Carbonero et al. (2011) determinaram uma prevalência de 82,1% de 346 rebanhos com 43,2% dos 2367 animais positivos. Puntel et al. (1999) analisou 390 Llamas (*Lama glama*) vindas de 9 fazendas localizadas em 3 diferentes estados da Argentina, testadas para vários vírus incluindo o BoHV-1. Apenas 0,77% (3/390) desta espécie de ruminantes teve prevalência do BoHV-1. Amostras de tanques de leite foram extraídas de fazendas localizadas na região central do Peru durante o ano de 1998. 27 das 60 fazendas colhidas tiveram anticorpos positivos para BoHV-1 com uma prevalência verdadeira de 51% (STAHL et al., 2002).

Vários relatos têm demonstrado sua ampla disseminação no rebanho bovino brasileiro. No Brasil, em 2008 rebanhos foram analisados no estado do Paraná e 73% testaram positivo para BoHV-1 com uma prevalência aparente de 59% nos 7.125 animais analisados (DIAS et al., 2013). Lovato et al. (1995) analisaram por soroneutralização 7.956 bovinos que provinham de 99 municípios do estado do Rio Grande do Sul. Os anticorpos dos vírus foram presentes em 18,8% do total de

amostras e em 91,9% dos municípios e com uma prevalência comprovada de 54,5% das 685 propriedades analisadas se mostrando disseminado pelo estado. Em outro estudo deste estado Campos et al. (2009) analisaram 200 amostras bovina por PCR para BoHV DNA (Tipos 1 e 5), oriundas do sul deste estado demonstraram uma prevalência de 82,8% positivas para o DNA de BoHV-1.

Das 775 amostras de 1.161 colhidas, submetidas a soroneutralização, demonstrou-se uma média de 66,75% positivas para BoHV-1 no estado do Espírito Santo (SANTOS et al., 2014).

Na região centro-oeste do Brasil, 6.932 animais em 892 propriedades de 232 municípios do estado foram coletadas entre março e setembro de 2002 e realizada pesquisa de anticorpos por soroneutralização para BoHV-1. A prevalência nos animais foi de 51,9%, com 98,5% das propriedades apresentando pelo menos 1 animal positivo e 100% dos municípios pesquisados apresentaram pelo menos 1 propriedade positiva demonstrando a alta disseminação em rebanhos bovinos deste estado, que vem na última década aumentando de forma considerável sua participação bovinocultura leiteira brasileira (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005).

Na região nordeste, especificamente no estado do Maranhão, 920 amostras de soro de animais não vacinados provenientes de 92 propriedades foram analisadas pelo ELISA sendo que 71,30% foram reagentes e pelo menos 1 animal de cada rebanho se apresentou positivo (BEZERRA et al., 2012). Em animais de 1 a 4 anos do estado da Bahia, Cerqueira et al. (2000) encontraram 56% positivos para BoHV-1 nos 558 soros analisados pelo ELISA, mostrando uma alta difusão dos vírus na população bovina deste estado.

2.2.5 Diarréia Viral Bovina (BVDV)

O BVDV foi detectado no soro em 61,5% dos bezerros e em 66,7% das vacas no sudoeste da França (VALACHER; HAGGLUND, 2006)

Em Alberta e Saskatchewan no Canadá, Durham e Hassard (1990) encontraram 40,6% de soro e 66,7% das propriedades positivas. Paton et al. (1998) coletou amostras de tanque de leite em 1079 rebanhos na Inglaterra e País de Gales

e as testou por ELISA para anticorpos de BVDV. A prevalência foi estimada em 95% dos rebanhos sendo que 65% dos positivos apresentou altos índices de anticorpos, sugestivo de infecções recentes.

Zaghawa (1997) no Egito coletou 652 soros de bovinos, búfalos, carneiros, cabras e camelos para verificar a presença de anticorpos para BVDV. A prevalência de anticorpos neutralizados para o BVDV foi de 49.2, 52.0, 27.5, 31.4, e 52.5% em bovinos, búfalos, carneiros, cabras e camelos respectivamente. Em 38 rebanhos de leite com 250 a 3000 vacas holandesas pesquisados no subúrbio de Mashhad no Irã, foram encontradas prevalência de 93,98% respectivamente. Nas provas realizadas em amostras obtidas dos tanques de leite 52,63% foram positivas indicando uma alta prevalência.

Na Tailândia foi pesquisada a epidemiologia do BVDV em rebanhos leiteiros pequenos não vacinados. Amostras de tanque de leite de 186 propriedades foram coletadas 4 vezes entre 2002 e 2004. A prevalência deste vírus em 2002 estava em 61% reduzindo para 48% dois anos depois. Segundo o autor esta redução foi devida ao programa de controle instituído (KAMPA et al., 2009).

Solis-Calderon, Segura-Correa e Segura-Correa (2005) estudaram a prevalência e os fatores de risco relacionados a BVDV na região de Yucatan no México. Amostras de sangue de 560 animais de 40 rebanhos distintos foram coletadas e testadas contra anticorpos de BVDV. 60% dos rebanhos apresentaram pelo menos 1 animal reagente e a prevalência foi estimada em 14%.

Samara, Dias e Moreira (2004) verificaram a ocorrência BVDV em rebanhos dos estados de São Paulo e Minas Gerais no Brasil. Foram retiradas amostras de 376 vacas em lactação de 10 propriedades diferentes. Todas as fazendas apresentaram animais reagentes sendo que na região sul de Minas Gerais a ocorrência foi de 57,6% e na região nordeste de São Paulo foi de 56,49%.

2.2.6 Mannheimia haemolytica e Pasteurela multocida

Katsuda et al. (2007) realizaram um estudo retrospectivo sobre a ocorrência de *M. haemolytica* no Japão entre os anos de 1987 a 2006. De 207 amostras

isoladas os sorotipos A1 (49,3%), A2 (22,7%) e A6 (20,3%) foram os mais comuns. Também foram relatados os sorotipos A7, A13 e A14. Em um surto ocorrido na fazenda do município de Iwate no Japão, 31% das vacas em lactação foram acometidas por pneumonia severa e o isolamento de *M. haemolytica* sorotipo 6 foi detectada em conjunto com VSRB.

A prevalência da *P. multocida* e outros patógenos respiratórios no trato respiratório de um total de 637 bezerros de 68 rebanhos escoceses foi investigada. Foram tomadas amostras de swab nasal profundo e as amostras positivas na cultura para *P. multocida* foram confirmadas por PCR. A prevalência da *P. multocida* foi de 17% (105 de 616 bezerros). 47% dos rebanhos apresentaram pelo menos 1 animal positivo sendo significativo a presença deste patógeno mais em rebanhos de leite do que de corte. A *P. multocida* foi associada com micoplasma e PI-3 detectados por cultura e análise de PCR respectivamente (HOTCHKISS; DAGLEISH; WILLOUGHBY, 2010). Nikunen et al. (2007) em um trabalho de associação de doenças respiratórias com status clínico identificou 14,3% de *P. multocida* em 84 amostras de lavado traqueal colhidas de bezerros oriundos de 18 rebanhos diferentes analisados.

Nos Estados Unidos, Al-Ghamdi et al. (2000), estudaram os sorotipos em 147 amostras de *M. haemolytica* obtidas nos estados de Minnesota, Dakota do Sul e Michigan, 60% eram do sorotipo 1, 26% do sorotipo 6, 7% representadas pelo sorotipo 2 e outros 7% divididos entre os sorotipos 9, e 11% sem tipagem. Em outro estudo americano no estado do Missisipi, De Rosa et al. (2000) isolaram de 40 swabs nasais e traqueais coletados aos pares, 60% dos pares possuíam *M. haemolytica* e 7,5% possuíam *P. multocida*. Entre todos os isolados, *M. haemolytica* representou 69% com sorotipo A1 e 23% com sorotipo A3. Welsh et al. (2004), fizeram um relato dos agentes isolados de amostras pulmonares de bezerros de corte com 6 a 18 meses de idade. Do total de amostras analisadas a *M. haemolytica* estava presente em 46,3%, enquanto a *P. multocida* se apresentou em 34,7% das amostras e o *H. somni* em 19%.

Há alguns relatos na América Latina. Em fazenda produtoras de leite no México, Jaramillo-Arango et al. (2007) obtiveram amostras de exsudato nasal de bovinos clinicamente sadios e infectados com pneumonia. *M. haemolytica* esteve mais presente nos bovinos doentes de até 1 ano de idade. Os isolados foram

compostos por 48% de sorotipo A1, 2,4% por A6 e 49,3% não tipados. Jaramillo-Arango et al. (2007) em outro trabalho com pulmões pneumônicos obtidos em matadouros, obtiveram 131 isolamentos, com 60,3% de *P. multocida*, 39,7% de *M. haemolytica*. As taxas de isolamento das amostras totais (n=475) foi de 16,6% de *P. multocida*, 10,7% de *M. haemolytica* e 0,2% de *M. glucosida*. Do total de *M. haemolytica* isolada, 33% corresponderam ao sorotipo 1, 17,6% ao sorotipo 2 e 49% não tipificado.

No continente africano, Zaher et al. (2014) investigaram o complexo de doenças respiratórias no Egito com ênfase em alguns patógenos virais e bacterianos. Em 227 amostras de swab nasal obtidas de vacas bubalinas foram isoladas 29 (12,78%) *P. multocida* e 24 (10,57%) *M. haemolytica*. Também se observou associações de *P. multocida* com VSRB (1,32%), com PI-3 (2,64%), com VSRB e PI-3 (1,76%), com BoHV-1 e PI-3 (0,88%), com PI-3 e *M. haemolytica* (0,44%) e com VSRB e BVDV (0,44%). Já *M. haemolytica* apresentou associações, além das citadas acima, com BoHV-1 (2,2%) e com BVDV (3,08%).

No Brasil são escassos os dados sobre ocorrência ou prevalência destes agentes. Viana et al. (2007) através de amostras colhidas por swabs estéreis no meio stuart em 262 ovinos, sadios ou doentes, em 17 propriedades distintas da região de Botucatu/SP isolaram *M. haemolytica* e *P. multocida*. A bactéria mais prevalente foi a *M. haemolytica* (47,3%), seguida pela associação de *M. haemolytica* e *P. multocida* (27,5%) e a *P. multocida* sozinha apresentou a menor taxa de isolamento (10,7%). Houve diferença estatística nas taxas de isolamento da nasofaringe e orofaringe. Houve maior isolamento na nasofaringe de animais doentes.

2.3 FATORES DE RISCO

Associados aos agentes infecciosos que causam pneumonia, há fatores de risco que contribuem para a maior suscetibilidade do animal em adquirir a enfermidade. Os fatores de risco que interagem na patogênese de pneumonias específicas são: o animal, o ambiente, o manejo e os patógenos (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Além de ter uma etiologia multifatorial, o CDRB ocorrerá sempre em condições ambientais desfavoráveis e práticas de manejo inadequadas estiverem presentes. As falhas nos mecanismos de defesa dos bezerros predispõem enfermidades respiratórias (COUTINHO, 2005). Portanto o desenvolvimento e a manutenção de um sistema imune eficiente, com intuito de prevenir doenças respiratórias, necessita da ingestão de colostro suficiente e de boa qualidade, boa nutrição, vacinação adequada, biossegurança e o fornecimento de ventilação adequada (GORDEN; PLUMMER, 2010).

A incidência das afecções do CDRB aumenta entre duas semanas a quatro meses de idade à medida que os níveis de anticorpos colostrais nas secreções das vias respiratórias diminuem. Quando as concentrações de imunoglobulinas, oriundas de processos imunes ativos específicos, começam a aumentar, a taxa de incidência de novos casos de problemas respiratórios diminui progressivamente. Portanto, a suscetibilidade ao CDRB aumenta à medida que a proteção conferida pelos anticorpos colostrais diminui. Em geral, a incidência é maior ao redor de quatro a oito semanas de vida, mas este período pode variar, dependendo do sucesso no manejo do neonato (COUTINHO, 2005). Radostits, Blood e Gay (2002) relata que a doença é mais comum em animais jovens, de seis meses a dois anos de idade porém, todos os grupos etários são suscetíveis.

A aglomeração de bovinos em leilões ou em feiras de exposição após um transporte estressante também é um risco na prática de criação de bovinos. Embora ocorra mais comumente em bovinos de corte jovens, após sua introdução nos sistemas intensivos de engorda, ela também ocorre em bovinos leiteiros, principalmente na introdução de novos animais ao rebanho ou quando estes retornam de exposições. Norstrom, Skjerve e Jarp (2000) concluiu em seu estudo que 190 surtos em 995 rebanhos ocorridos na Noruega, entre o inverno e primavera (Jan-Abr) no ano de 1995, foi ocasionado provavelmente pelo VSRB, infectando animais transportados entre as regiões afetadas, não descartando em alguns casos a ocorrência de agente secundários. A ocorrência de surtos progrediu entre fazendas vizinhas na região sudoeste durante 17 semanas (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Muitas vezes, as instalações utilizadas na criação de bezerros são as mais deficientes da propriedade. O ambiente exerce influência determinante sobre a

saúde dos animais e, independentemente do tipo, as instalações somente serão adequadas se mantidas limpas, secas, com corrente de ar, confortáveis e permitirem um manejo eficiente dos animais. Flutuações rápidas de temperatura, a capacidade de ventilação e a densidade animal em uma instalação são fatores determinantes na intensidade de patógenos presentes no ar. Falhas no processo de ventilação podem acarretar elevadas taxas de morbidade e mortalidade pelo CDRB. Caso a excessiva umidade produzida em uma instalação de bezerros não for removida, o ar se tornará impuro e úmido. Altos índices de umidade relativa do ar podem promover a sobrevivência de bactérias, mantendo-as viáveis em gotículas de água suspensas no ar (aerossóis) (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; COUTINHO, 2005).

O calor produzido pelos animais dentro de uma instalação, especialmente durante os meses mais quentes do ano, pode aumentar excessivamente a temperatura, deixando o ambiente desconfortável aos animais. O movimento de ar proporcionado por uma ventilação eficiente é suficiente para colocar a temperatura em níveis confortáveis. Em regiões muito quentes, pode ser considerado a utilização de medidas suplementares, como os ventiladores. As condições ótimas de temperatura ambiente para bezerros de raças leiteiras europeias são 10 a 15,5°C (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; COUTINHO, 2005).

Em instalações ineficientes, o ar se torna contaminado com gases (monóxido de carbono) e substâncias voláteis eliminadas pelos animais pelas fezes e urina (metano, dióxido de carbono, amônia, sulfeto de hidrogênio). A concentração de amônia e sulfeto de hidrogênio pode ser minimizada por práticas adequadas de remoção de dejetos e higiene, mas o excesso destes gases e aqueles resultantes da respiração dos animais devem ser removidos pela ventilação. Como regra prática, pode-se utilizar uma taxa de ventilação mínima de quatro trocas de ar completas por hora. As instalações para bezerros devem estar em uma área afastada, suficientemente distante daquelas utilizadas por animais adultos, e possuir ventilação independente (COUTINHO, 2005).

O desmame de bezerros durante um clima adverso pode aumentar o estresse do desmame ocasionando surto de doenças respiratória. O agrupamento em lotes após desmama não é aconselhável, porque causa estresse nos indivíduos, diminuindo a competência do sistema imune. O manejo no curral realizado de maneira grosseira também é estressante resultando em queda da imunidade. Caso

existam vírus ou bactérias circulando no animal, estes terão oportunidades por estas razões citadas acima a se multiplicarem mais intensamente (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). As instalações individuais, como as casinhas utilizadas na criação de bezerras de raças leiteiras, podem proporcionar melhores resultados, desde que manejadas adequadamente. No caso do uso de instalações coletivas, a superlotação pode aumentar a umidade do ar e a quantidade de patógenos circulantes favorecendo aumento na incidência do CDRB ou a ocorrência de surtos devido ao contato direto (COUTINHO, 2005).

2.4 PATOGÊNESE

Há vários mecanismos que interagem na patogênese da CDRB.

2.4.1 Mecanismos de defesa pulmonar

As vias aéreas principais e o parênquima pulmonar, em condições normais, impedem a entrada e neutralizam ou removem agentes nocivos se mostrando um complexo mecanismo de defesa. Muitas infecções respiratórias são causadas por partículas em aerossóis que transportam agentes infecciosos do ambiente exterior ou do próprio trato respiratório. O agente etiológico deve sobreviver no aerossol e se depositar em um ponto do trato respiratório que esteja vulnerável por qualquer motivo e, a seguir, multiplicar-se (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Em condições normais, um complexo de mecanismos bioquímicos, fisiológicos e imunológicos protege as vias respiratórias das partículas inaladas sejam estas lesivas ou infecciosas. Como defesa contra organismos nocivos são utilizados os mecanismos que podemos destacar: barreira física, caracterizada pela filtração aerodinâmica, espirros, transporte mucociliar, reflexo de tosse e os componentes secretórios presentes no muco e a defesa celular com a presença principalmente de macrófagos alveolares e anticorpos do trato respiratório inferior e sistêmicos (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; GONÇALVES; FEITOSA, 2004;

COUTINHO, 2005).

Partículas em aerossóis inaladas tidas como grandes são removidas pela cavidade nasal, e apenas pequenas partículas conseguem chegar aos pulmões. Nas vias aéreas superiores praticamente 100% das partículas maiores que 10 μm e 80% das que tem 5 μm são removidas pela ação gravitacional das mucosas. Caso as partículas se depositem após dois terços da cavidade nasal elas serão removidas pelo mecanismo de depuração mucociliar (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A depuração muco-ciliar tem importante papel na defesa física do pulmão contra patógenos inalados. O muco engloba e transporta as partículas estranhas à faringe onde geralmente elas são deglutidas. O muco também é responsável pela absorção de gases e outras substâncias químicas inaladas e umidificando o ar inalado mantendo a mucosa hidratada. Estão presentes anticorpos, principalmente IgA, lactoferrina e lisozima que juntos propiciam a defesa imunológica. Sua produção ocorre principalmente pelas glândulas submucosas e células caliciformes e é secretado sempre que partículas inaladas tocam a mucosa e estimulam sua produção englobando-as, transportando-as cranialmente pela atividade muco-ciliar. Também estão presentes no muco o líquido alveolar surfactante e células alveolares incluindo macrófagos, que são atraídos para o muco por meio da tensão superficial (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). Bertagnon et al. (2007) determinou em seu estudo que tanto na região traqueobrônquica quanto na região bronco-alveolar de bezerros sadios de até um mês de vida e que mamaram colostro adequadamente, os teores de IgG são maiores do que de IgA.

O muco é uma substância complexa sendo constituído na sua maioria por água (95%) e por uma combinação de glicoproteínas, proteoglicanos, lipídeos, carboidratos e minerais. A mucina é o principal componente não aquoso. A eficácia da mucocinese pode ocorrer em diferentes condições de viscosidade, porém caso o muco se apresente muito fluído, a tendência, é que as partículas movam-se em direção aos alvéolos e no caso de muito espesso o mesmo poderá permanecer nas vias aéreas anteriores (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

No caso de doença respiratória, esta depuração mucociliar pode ficar comprometida devido interrupção da sua atividade ou alterações na sua quantidade e qualidade. No caso de doença viral pulmonar poderá ocorrer perda de cílios ou lesões na mucosa, interrompendo desta forma a atividade ciliar. O aumento da

viscosidade do muco é comum em alterações do sistema respiratório, principalmente devido a destruição de leucócitos e células epiteliais, podendo também ocorrer aumento de glicoproteínas, afetando suas propriedades mucocinéticas. A ocorrência de secreções purulentas aumenta a elasticidade, que associada ao aumento da viscosidade também interfere na mucocinese. A ocorrência de secreções amareladas ou esverdeadas são devidas à presença da enzima mieloperoxidase, liberadas pelos leucócitos ou pelo grande número de eosinófilos presentes (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Os bovinos são mais predispostos a ter lesões pulmonares mais acentuadas do que outras espécies, devido as suas características respiratórias anatômicas e fisiológicas. Esta espécie tem uma limitada capacidade respiratória de intercâmbio gasoso, resultando em uma maior atividade ventilatória basal. Esta maior atividade basal pode resultar em uma contaminação mais acentuada do ar inspirado por substâncias nocivas, sejam elas infecciosas ou alergênicas (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Os fagócitos constituem a próxima linha de defesa. A fagocitose é um mecanismo de defesa inata crítico, mas também é um evento em que as respostas imune inata e adaptativa se unem (JANEWAY; TRAVERS, 2005). Os macrófagos são os primeiros fagócitos a encontrar os patógenos. Os macrófagos são maturados continuamente a partir de monócitos do sangue que deixam a circulação e migram para vários tecidos. Eles são encontrados em grandes números tanto no interstício quanto nos alvéolos pulmonares. Eles expressam vários receptores para muitos componentes bacterianos que incluem receptores para carboidratos bacterianos (receptores de manose e glucana), lipídios (receptor de LPS, CD14) e outros componentes derivados de agentes patogênicos (receptores toll-like).

A IL-8 é um quimioatrativo para os neutrófilos, recrutando-os em grandes números para o pulmão. Os macrófagos e neutrófilos desempenham um papel chave na imunidade inata, uma vez que eles podem reconhecer, ingerir e destruir muitos agentes patogênicos, sem a ajuda da resposta imunitária adaptativa. No entanto, a internalização e morte de agentes patogênicos é um pré-requisito essencial para o processamento do antígeno microbiano, e a sua apresentação para a indução de uma resposta imune adaptativa específica contra o patógeno

(HENNEKE; GOLENBOCK, 2004). Os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, são extremamente importantes para estas funções.

2.4.2 Desenvolvimento da pneumonia

O desenvolvimento da pneumonia irá variar de acordo com agente responsável, pela sua virulência, bem como pela via de acesso utilizada para chegar aos pulmões.

Bactérias podem ser introduzidas em grande quantidade pelas vias respiratórias, causando bronquiolite primária e se disseminando assim como, envolvendo o parênquima circundante. O tecido pulmonar poderá reagir dependendo do agente etiológico envolvido, podendo formar um processo fibrinoso agudo em infecções por *Pasteurella sp*, uma lesão necrosante nas infecções por *Fusobacterium sp* ou lesões caseosas ou granulomatosas crônicas no caso do agente ser fungos ou micobactérias. A lesão poderá se disseminar no pulmão por continuidade ou pela movimentação de material contaminado pelos bronquíolos, favorecido pelos movimentos normais do epitélio ou pela tosse. Falhas na resposta terapêutica podem ter como causas a bronquiectasia e os abscessos pulmonares. Caso as bactérias cheguem aos pulmões pela via hematógena, o resultado será a formação de focos sépticos podendo ficar mais acentuados formando os abscessos. O rompimento destes abscessos nas passagens aéreas irá se disseminar como uma broncopneumonia secundária (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Os vírus também são introduzidos principalmente pela inalação, causando bronquiolite primária. A sua disseminação para os alvéolos causam um aumento e proliferação das células epiteliais alveolares e o desenvolvimento de edema alveolar. A presença de agregados linfocíticos em torno dos alvéolos, vasos sanguíneos e bronquíolos também são achados sob o ponto de vista histológico. Esse tipo de reação intersticial é característico da pneumonia viral (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A interferência entre as trocas gasosas entre o ar alveolar e o sangue, independentemente da maneira pela qual as lesões se desenvolvem é o que

caracteriza a fisiopatologia das pneumonias. Há uma restrição na troca gasosa devido a obliteração dos espaços alveolares e obstrução das passagens aéreas. O oxigênio começa a diminuir gradativamente no sangue com provável acompanhamento de uma cianose no animal. Quando a porção pulmonar se consolida, a circulação sanguínea fica interrompida observando-se uma cianose menos acentuada. Em uma reação de compensação o animal começa a respirar superficialmente diminuindo ainda mais a oxigenação do sangue. Há ocorrência de acidose pela retenção de dióxido de carbono sendo mais provável de acometer o animal nos estágios iniciais da pneumonia (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Em experimentos utilizando bezerros gnotobióticos ou seja, animais livres de patógenos específicos (LPE) como as cobaias de laboratório, a inoculação endotraqueal de *Mycoplasma* spp. não resultou em doença clínica significativa porém exames histológicos revelaram pneumonia de 2 a 3 semanas após a inoculação. Atelectasia, bronquiolite catarral e a “formação de manguitos” peribronquiolar e perivascular caracterizam as lesões produzidas por infecções experimentais de *M. bovis*, *M. díspar* e *Ureaplasma* spp. Os *Mycoplasmas* spp. produzem lesões pulmonares nas formas clínicas e inaparentes atuando de maneira sinérgica entre si ou com vírus e bactérias que estejam presentes (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Nos bovinos clinicamente normais, a *M. haemolytica* se apresenta em baixos números na tonsila e nas passagens nasais com predominância do isolamento do tipo A2 não associada a febre do transporte. Em casos de exposição de bovinos saudáveis à fatores de estresse, a *M. haemolytica* A1 cresce de maneira rápida e coloniza as vias aéreas superiores. Em condições normais, mecanismos fagocitários utilizados pelos macrófagos alveolares eliminam as pasteurelas de maneira eficaz. Há um influxo de neutrófilos nos pulmões nas primeiras horas após uma inoculação bacteriana. Quando expostos a *M. haemolytica* os macrófagos liberam ânion superóxido. A capacidade da resposta ao agente dependerá da presença de anticorpos opsonizados o do volume de microrganismos apresentados ao fagócito (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A capacidade da bactéria causar danos e a intensidade destes, estão associados aos fatores de virulência do agente. Quatro fatores são associados com a *M. haemolytica* sendo eles as fímbrias, cápsula de polissacarídeos, endotoxina (lipopolissacarídeo) e as leucotoxinas. A colonização do trato respiratório superior é

intensificado pelas fímbrias. A cápsula polissacarídica inibe a morte sérica mediada pelo complemento, a fagocitose e a morte intracelular da bactéria. A migração de neutrófilos e a adesão da *M. haemolytica* ao epitélio alveolar também é intensificada pela cápsula. Os leucócitos tem a sua função alterada pelo lipopolissacarídeo que também é extremamente tóxico para o endotélio bovino. Sua capacidade de modificar a hemodinâmica circulatória ocasiona a elevação de prostanoídes, serotonina, AMPc e o GMPc circulantes. Este agente altera morfológicamente as células endoteliais dos bovinos. Experimentalmente, pode ocorrer sinergismo entre *M. haemolytica* e *M. bovis*, causando pneumonia em bezerros LPE. A pasteurelose pode ser reproduzida experimentalmente, sem infecção viral prévia, sendo provável a sua ocorrência natural sem a presença dos vírus (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Os vírus causam pneumonia intersticial principalmente nos lobos craniais porém a intensidade por variar de inaparente a altamente fatal. Em infecções inaparentes de PI-3 não há sinais clínicos mas a soroconversão ocorre, e achados histológicos demonstram lesões consistentes de bronquiolite, hiperplasia epitelial bronquial e bronquilar, epitelização alveolar e formação sincicial de células gigantes. Em casos moderados, tosse e polipnéia ocorrem. Foi observado após inoculação intranasal de PI-3 a ocorrência da doença em uma forma muito similar a forma espontânea. Em poucos dias havia bronquite e bronquiolite presentes bem como exsudato celular com predominância de células mononucleadas nos lúmens pulmonares. A medida que ocorre o agravamento das lesões, há uma espessamento e hiperplasia das células alveolares até que o processo de cicatrização começa a ocorrer a partir dos 14 dias após infecção induzida (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Experimentalmente o PI-3 pode acometer macrófagos alveolares e também prejudicar a depuração muco-ciliar fornecendo possivelmente desta forma meio para a *M. haemolytica* estabelecer uma infecção secundária. Após pneumonia viral primária, diversas bactérias comensais do animal acometido podem invadir e colonizar as vias aéreas posteriores causando pneumonia variável de acordo com agente envolvido. Geralmente respondem ao tratamento tendo a intensidade de recidivas de acordo com a intensidade da infecção viral. Os vírus destroem os cílios

e diminuem a resistência das mucosas propiciando a entrada das bactérias (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A ação do VSRB em bezerros ocasiona rinite, bronquite, bronquiolite proliferativa e exsudativa, com acompanhamento de colapso alveolar e formação de células gigantes sinciciais multinucleadas no revestimento epitelial e no lúmen dos bronquíolos e alvéolos. Na fase aguda há disfunção pulmonar compatível com doença obstrutiva difusa sendo que as lesões resultantes podem prejudicar a mucocinese predispondo a uma broncopneumonia. O uso de animais LPE inoculados com VSRB não provocou a doença porém produziu lesões macroscópicas evidentes e as demais relatadas anteriormente. Já em formas mais graves de infecção, há dispnéia grave, animal respira pela boca e apresenta ruídos expiratórios. Pode vir a óbito, sem a ocorrência de broncopneumonia secundária. Casos de pneumonia fatais e agudos pelo VSRB ainda não são bem compreendidos, e apresentam lesões características de bronquiolite exsudativa ou necrosante, edema intersticial e enfisema (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

O BoHV-1 infecta as cavidades nasais e o trato respiratório superior causando rinite, laringite e traqueíte. Há danos consideráveis dos cílios na traqueia, a inoculação intra-traqueal do vírus resulta na perda de quase todas as células colunares causando desta forma muitos danos ao mecanismo de depuração mucociliar. O vírus causa conjuntivite com edema e tumefação da conjuntiva, acessando o tecido ocular possivelmente por meio dos ductos lacrimais. Este vírus também pode causar variados graus de obstrução pulmonar causando dispnéia, retenção de dióxido de carbono e um maior volume pulmonar residual destes. Nas constrições excessivas das vias aéreas podem comprometer ainda mais os mecanismos de defesa permitindo o desenvolvimento de pneumonia bacteriana secundária que pode levar a morte do animal (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

2.4.3 Evasão dos patógenos ao sistema imune

Devido à sua importância na indução de resposta imune inata e adaptativa, patógenos evoluíram estratégias para combater os fagócitos (COOMBES et al.,

2004). As estratégias desenvolvidas por um agente patogênico pode resultar na exacerbação da doença.

Por exemplo, a infecção por BoHV-1 provoca danos ao epitélio respiratório prejudicando o mecanismo de defesa muco-ciliar que favorece a *M. haemolytica* para migrar para os pulmões, proliferar, elaborar os determinantes de virulência e causar doença. A infecção das células do sistema imunitário pelo BVDV, e a inibição da proliferação das células pelo BVDV, BoHV-1, VSRB e indução apoptose células T CD4 + por BoHV-1, comprometem a organização da resposta imune contra todos os patógenos. A indução de apoptose em células CD4+Th por BoHV-1 prejudica a elaboração de citocinas que promovem o desenvolvimento dos elementos efetores de respostas imunes humorais e mediadas por células. A regulação negativa da expressão de MHC de classe I do BoHV-1 compromete o desenvolvimento da resposta de linfócitos T citotóxicos contra o BoHV-1, bem como o BVDV, VSRB e PI-3 (SRIKUMARAN; KELLING; AMBAGALA, 2008).

A citólise de todos os subconjuntos de leucócitos pela leucotoxina da *M. haemolytica* elimina as células vitais na montagem das respostas imune inata e adaptativa. Além disso, resulta na liberação de produtos químicos tóxicos que causam dano agudo em relação ao epitélio pulmonar. Estabelecimento de infecções latentes e persistentes por BoHV-1 e o BVDV, e variação antigênica pelo *M. bovis*, acrescentam outra dimensão à evasão imune em CDRB. Assim CDRB é de fato uma doença complexa. A gravidade da doença, e a taxa de mortalidade num rebanho muito provavelmente dependerá do número de patógenos que infectam os animais simultaneamente. Co-infecções experimentais de animais com o BVDV/VSRB e BoHV-1/*M. haemolytica* apoiam esta idéia. A etiologia complexa e a multiplicidade de estratégias de evasão imune desenvolvidas por estes patógenos provavelmente explicam o fracasso das vacinas para fornecer proteção completa contra esta complexa doença (SRIKUMARAN; KELLING; AMBAGALA, 2008).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

É comum os clínicos de campo encontrarem um grupo de bovinos acometidos por doença respiratória aguda de difícil diagnóstico. A broncopneumonia é a causa

da doença porém determinar a sua etiologia é o mais complicado. O estabelecimento do diagnóstico clínico preciso e de forma rápida, levando em conta os achados clínicos e epidemiológicos da propriedade, é de fundamental importância para evitar que a doença se espalhe no rebanho. Deve-se ter em mente o objetivo de se estabelecer um tratamento racional e econômico, principalmente se as vacas lactantes forem afetadas. Tratamentos em massa deverão ser analisados levando-se em conta as perdas financeiras envolvidas. De qualquer forma o manejo clínico do surto consistirá do tratamento dos casos aparentes e da escolha de se tratar ou não tratar preventivamente o restante dos animais em risco. A diferenciação entre as doenças respiratórias com base nos achados clínicos é difícil devendo o clínico portanto iniciar uma terapia com um antibiótico eficiente contra as principais bactérias etiológicas, mesmo antes do resultado de uma avaliação laboratorial. Porém é possível diferenciar a pneumonia intersticial viral da broncopneumonia baseando-se principalmente nos sinais clínicos que demonstram a extensão do acometimento pulmonar (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). De maneira geral, pneumonia intersticial possui alterações apenas no interstício enquanto a broncopneumonia além dos sinais no interstício também tem sinais clínicos de alterações bronquiais (GONÇALVES; FEITOSA, 2004).

Vários animais com alterações típicas deverão ser analisadas para tentar se estabelecer diagnóstico. Tanto o trato respiratório superior quanto o inferior devem ser observados em busca de lesões, porém alguns indícios no trato inferior são determinantes na indicação da gravidade da doença. A presença de toxemia, depressão, febre, anorexia e agalactia em vacas leiteiras indica uma infecção bacteriana primária ou secundária. Realizando exame clínico criterioso, o técnico a campo deverá utilizar da auscultação e percussão como ferramentas valiosas para um correto diagnóstico. A correta aplicabilidade da técnica poderá se determinar em qual estágio a doença está, a natureza da lesão e a delimitação da área afetada (GONÇALVES et al., 2001).

Radostitis, Blood e Gay (2002) relataram que a broncopneumonia bacteriana, é acompanhada por tosse produtiva e dolorosa. Na sua forma aguda são encontrados toxemia, anorexia, depressão, taquicardia e relutância para deitar. Já em casos crônicos há toxemia crônica, pelagem áspera e emagrecimento. Os parâmetros das frequências respiratória e cardíaca estão geralmente alterados. A

febre pode ceder quando o animal desenvolve uma pneumonia crônica. Respiração bucal e ruído expiratório podem ser encontrados nos estágios mais avançados da doença. É comum secreção nasal mucopurulenta bilateral com tosse produtiva. As crepitações são geralmente audíveis em todo pulmão e se apresentam de forma mais pronunciada nas porções ventrais pulmonares.

Se for na forma secundária, os casos tendem a ser mais graves com febre, dispnéia e toxemia. Sendo que com a *Pasteurella* spp. a temperatura pode ficar entre 41 a 41,5 °C com uma grande área pulmonar acometida, apresentando sons altos e ásperos devido ao edema, crepitação e ruído pleural. Se for *Truoperella pyogenes* poderá haver grandes áreas do parênquima consolidado e presença de grave toxemia e ruídos respiratórios altos. No caso de *Fusobacterium necrophorum*, os achados clínicos são semelhantes aos da *Truoperella pyogenes* com a possível presença de abscessos pulmonares. Nestes casos, podem ocorrer lesões necróticas na boca e na faringe, caracterizados como pontos de origem da infecção e responsáveis pelos casos de recidiva aos animais que respondam adequadamente ao tratamento inicial. Em bezerras jovens, o *M. bovis* caracteriza-se pelo rápido estabelecimento de dispnéia grave, febre, rápida deterioração e ausência de resposta ao tratamento (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Benesi et al. (2013) consideraram em seu trabalho de determinação da microbiota traqueobrônquica de bezerras de até 1 mês de vida que, eram doentes com broncopneumonia, os bezerras que apresentassem pelo menos duas das manifestações a seguir listadas: temperatura retal acima de 39,5°C, secreção nasal mucopurulenta ou purulenta, reflexo positivo de tosse, estertores ou crepitação na auscultação pulmonar e aumento da frequência respiratória acima de 40 MR/min.

Para Gonçalves et al. (2001) a broncopneumonia é caracterizada pela alteração inflamatória de brônquios, bronquíolos e parênquima pulmonar. Na inspeção a campo forte indício de grande comprometimento nas trocas gasosas é o aumento da frequência respiratória. O corrimento nasal pode ser de origem brônquica ou pela inflamação da mucosa nasal. Tosse como resposta positiva a estimulação de seu reflexo, indica comprometimento da traquéia. No parênquima pulmonar, são sinais de comprometimento a presença de dispnéia mista, sons submaciços ou maciços à percussão e a auscultação de áreas aumentadas de ruído traqueobrônquico e bronquiolar e áreas de silêncio.

A dispnéia mista revela consolidação dos pulmões e a sua intensidade será fundamental na interferência das trocas gasosas. O mesmo pode ser dito em relação a presença de submaciez e maciez à percussão. O aumento dos sons respiratórios deve-se a melhor condução dos sons produzidos na respiração em uma maior quantidade de líquido intersticial provocado pela inflamação dos pulmões. Áreas de silêncio indicam comprometimento funcional do órgão pela obstrução física dos brônquios, bronquíolos e alvéolos. Os brônquios inflamados produzem líquido e dependendo de sua localização anatômica e quantidade presente, produzirão diferentes sons à auscultação. A crepitação grossa indica presença de muito líquido nos brônquios de maior calibre, a crepitação fina demonstra líquido nos bronquíolos e brônquios de menor calibre, que quando obstruídos causam interrupção da respiração. Pode também ocorrer a presença de frêmito torácico e traqueal de acordo com as quantidades de líquido presente. Ruídos ou vibrações graves e agudas podem resultar em ronco que é a passagem de ar por secreções depositadas nas vias aéreas. Pode ocorrer pleurite e roce pleural devido ao atrito dos folhetos pleurais inflamados. Um odor pútrido é notado nas pneumonia gangrenosas (GONÇALVES et al., 2001).

Gonçalves et al. (2001) realizaram um trabalho onde, foram avaliados 48 bezerros sadios e doentes entre 1 e 6 meses de idade, com objetivo de determinar a diferenciação dos sinais clínicos da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. As presenças de frequência respiratória aumentada, dispnéia mista, submaciez ou maciez, área de silêncio, crepitação grossa e os roncos e sibilos definiram o quadro como grave.

Na pneumonia intersticial viral há tosse seca e áspera. A auscultação revela ruídos ásperos sugerindo exsudato presente. A cianose pode ocorrer quando grande parte dos pulmões forem acometidas. A quantidade de exsudato bronquiolar e a presença de inflamação nas vias aéreas superiores poderá ou não expor secreção nasal. O odor respiratório de decomposição pode ocorrer devido ao grande acúmulo de pus nas passagens aéreas. Os animais geralmente não apresentam toxemia mas podem se apresentarem febris, inapetentes e anoréxicos. Nos casos mais difusos e consequentemente mais graves podem apresentar uma angústia respiratória grave, falha na resposta a terapia e morrer em poucos dias. Animais acometidos podem ainda apresentar-se gravemente dispnéicos, inquietos, respirando pela boca e

gemendo após a expiração. Neste estágio por ocorrer colapso levando a morte por insuficiência respiratória asfixiante (RADOSTITIS et al., 2002).

A doença tende a ser mais grave em animais sem exposição anterior ao vírus. Tosse seca não produtiva, dispnéia e polipnéia graves, bem como corrimento nasal são característicos. Febre de 40 a 42 °C entre 3 a 5 dias é comum em animais adultos havendo quedas na produção de leite e consumo de alimentos apesar de se apresentarem alertas. A presença de ruídos altos nos lobos ventrais pode indicar consolidação e sibilos são audíveis em suas regiões periféricas indicando bronquiolite. Nas faces dorsais dos pulmões são ouvidos sons altos de crepitação devido a enfisema intersticial. Pode ser fatal em até 2% dos casos. Porém a maior parte dos animais recupera-se entre 5 a 7 dias (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

O VSRB pode estabelecer de forma súbita uma pneumonia e está presente entre 50 a 80% dos bezerros leiteiros com sinais clínicos de uma pneumonia viral grave. Geralmente acomete animais entre 12 a 16 meses sendo inicialmente notado pelo proprietário tosse, corrimento nasal moderado, perda do apetite, febre acima de 40 °C durante 3 dias com posterior recuperação podendo persistir os sintomas em alguns dos animais. Até metade dos animais acometidos podem apresentar respiração abdominal e ruídos pulmonares altos e anormais. Comumente os casos apresentam resolução em 10 dias (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Infecções de BoHV-1 apresentam sinais com grande variação de gravidade devido cepa do vírus presente, a faixa etária acometida e a fatores ambientais. Nos Estados Unidos a doença geralmente se apresenta de forma mais branda tanto nos rebanhos leiteiros como o de corte tendo uma maior intensidade geralmente nos confinamentos pela grande aglomeração e origem de diversas fontes. De forma repentina são observados anorexia, tosse alta, febre de até 42 °C, hiperemia grave da mucosa nasal com presença visual de necrose nos septos nasais, corrimento seroso nasal e lacrimal bilateral, aumento da salivação, queda na produção e de vez em quando estão ligeiramente hiperexcitados. Ocorre aumento da frequência e amplitude respiratória, presença de estertores úmidos à auscultação, quando associados a pneumonia bacteriana secundária. A traqueíte pode provocar dispnéia inspiratória com ruídos anormais na respiração traqueal. Há angústia respiratória ao esforço físico e em alguns surtos, tosse curta e forte podendo ocorrer morte súbita nas primeiras 24 horas após início dos sintomas. Os animais acometidos não

retornam à produção por 10 a 14 dias. Em animais de engorda geralmente a doença tem maior duração, com febre mais persistente e corrimento nasal purulento, com período convalescente mais extenso. Podem ocorrer morte nos picos febris, porém em sua maioria são devidas as broncopneumonias secundárias que podem se prolongar durante meses até o animal desenvolver dispnéia grave, anorexia completa e decúbito esternal. Animais que se curam podem continuar apresentando sons ruidosos e uma mucosa nasal áspera e espessa com corrimento (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

2.6 TRATAMENTO

O tratamento da pneumonia em bovinos deve ser baseado no controle das infecções, na manutenção da pressão intrapleurar, do fluxo de ar nas vias aéreas e dos mecanismos de limpeza traqueobrônquicos, além de preservar as trocas gasosas e remover agentes irritantes (GONÇALVES, 2004).

O veterinário no campo deve fazer na propriedade as investigações clínicas e epidemiológicas necessárias para solucionar o problema tratando-o e verificando se há ocorrência de algum fator risco predispondo ao surgimento da doença. Os animais devem ser monitorados quanto ao surgimento de novos casos observando alterações clínicas como depressão, corrimento nasal e dispnéia. O quadro da doença nos animais tratados deve ser monitorado continuamente sendo que uma resposta benéfica à terapia instituída, deve ser evidente nas primeiras 12 a 24 horas com redução da temperatura corpórea e a melhora na aparência e no apetite dos animais acometidos (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A presença de toxemia e febre são fortes indicativos de uma pneumonia bacteriana primária, porém pneumonia intersticial viral seguida por uma bacteriana secundária não deve ser descartada. Como observado, a presença bacteriana é praticamente certa sendo o uso de antibióticos de fundamental importância. O uso de anti-inflamatórios concomitante aos de antibióticos é muito comum na tentativa de reduzir a febre e a inflamação pulmonar promovendo melhora sintomática com o retorno do apetite e da disposição. Broncodilatadores e mucolíticos tem sido indicados por melhorar a mucocinese e aliviar a dificuldade respiratória. Uma terapia

suporte pode ser necessária de acordo com a gravidade de cada caso devendo incluir a instituição de nutrição parenteral ou oral forçada, a reposição dos eletrólitos e quando possível a provisão de oxigênio nos casos mais críticos. Se identificados, fatores de risco devem também ser corrigidos como deficiência nas instalações ou erros de manejo. Os animais doentes devem ficar em um local seco, ventilado, com temperatura e umidade adequados, confortável e livre de poeira. Alimentos palatáveis devem ser oferecidos desde que não se apresentem na forma em pó junto com água fresca em abundância (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

No caso de um surto, o técnico deve decidir se realiza medicação em massa dos animais não acometidos tendo sempre em mente a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana e a presença de resíduos de antibióticos. Há opção por ministrar o medicamento na água, adicionado ao alimento ou realizar tratamentos individuais injetáveis porém, não há validação científica do uso na água ou nos alimentos (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Os antimicrobianos mais comumente utilizados no início das infecções são oxitetraciclina, na dose de 10 mg/kg IM, penicilina G procaína, na dose de 30.000 a 45.000 UI/kg IM, sulfa com trimetopim, na dose de 3 mL/45 kg de peso vivo IM. Outras drogas também são altamente eficazes como a tilmicosina, na dose de 10 mg/kg subcutâneo, o florfenicol, na dose de 20 mg/kg IM em intervalos de 48 horas (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). Para tratamento de bovinos pode-se utilizar a tulatromicina em dose única subcutânea de 2,5 mg/kg de peso corporal (equivalente a 1mL/40kg de peso corporal)

No Brasil, Viana et al. (2007) testaram a eficiência de diversos antibióticos contra *M. haemolytica* e *P. multocida*. Enrofloxacin, Florfenicol, ciprofloxacina, sulfametazol/trimetropin foram os antimicrobianos que apresentaram maior eficiência enquanto a tetraciclina teve a maior taxa de resistência. Já Soares et al. (2007) apresentaram um perfil de sensibilidade de amostras de *P. multocida* e *M. haemolytica* isoladas na região de Botucatu/SP entre janeiro de 2000 a novembro de 2007. Houve grande variação de eficácia indicando a presença de bactérias resistentes. Em relação a *P. multocida*, a sulfa com trimetropin apresentou 75,54% enquanto florfenicol e ciprofloxacina tiveram 100%. Contra *M. haemolytica*, a gentamicina apresentou 80% e a ampicilina 100% de eficácia.

Welsh et al. (2004) trabalharam com isolamento e susceptibilidade antimicrobiana de agentes encontrados em amostras pulmonares entre os anos de 1994 - 2002 nos Estados Unidos. Houve um decréscimo significativo com o passar dos anos na sensibilidade da *M. haemolytica* a eritromicina, florfenicol, espectinomicina, tilmicosina enquanto com que com a *P. multocida* foi observado um decréscimo da sensibilidade contra sulfa com trimetropin, tetraciclina, tilmicosina, eritromicina, sulfacloropiradizina, florfenicol e espectinomicina. Em outro trabalho realizado no Estados Unidos e Canadá, Portis et al. (2012) testaram a susceptibilidade antimicrobiana de *M. haemolytica*, *P. multocida* e *H. somni* responsáveis por problemas respiratórios em bovinos durante os anos de 2000 a 2009. O ceftiofur foi muito eficaz contra todos os agentes. A penicilina apresentou boa sensibilidade contra *P. multocida* e *H. somni* porém não foi muito eficaz contra *M. haemolytica* apresentando sensibilidade entre 41 a 67% das amostras. A tetraciclina apresentou menos de 50% de sensibilidade durante vários anos mostrando uma grande resistência a este antibiótico.

2.7 PREVENÇÃO

A falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) é um fator importante no desenvolvimento e gravidade de doenças respiratórias em bezerros. Quase 20% dos bezerros recém nascidos nos Estados Unidos tem FTIP. O gerenciamento do colostro e o monitoramento da FTIP fazem parte de um bom programa de controle de doenças respiratórias. Bancos de colostro devem processar e armazenar colostros de forma a minimizar contaminações bacterianas. O ideal é ter uma contagem bacteriana total (CBT) menor do que 1 milhão de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e a contagem de coliformes menor do que 10.000 UFC/mL. Um colostro de alta qualidade deverá ser oferecido sendo que o mesmo deverá conter no mínimo 50 g de IgG por litro. O fornecimento ocorrerá preferencialmente de 1 a 2 horas após o nascimento utilizando uma mamadeira ou sonda esofageana a fim se assegurar o consumo do volume adequado (GORDEN; PLUMMER, 2010).

A adequada cura do umbigo após o nascimento causou redução pela metade

na mortalidade e uma diminuição nos animais tratados de 19% para 5% entre grupos sem cura e com cura do umbigo respectivamente. O uso de sprays na cura do umbigo deve ser evitado sendo a melhor opção, o mergulho do umbigo em um recipiente limpo contendo desinfetante fresco o que proporcionará uma melhor cobertura das superfícies interna e externa do umbigo (GORDEN; PLUMMER, 2010).

Uma nutrição adequada também é essencial para rápido crescimento e desenvolvimento de bezerros jovens. O consumo de nutrientes pelo sistema imune cresce rapidamente em resposta a um desafio microbiano. A taxa de glucogênese pode aumentar em até 200% durante uma infecção moderada. Em ratos de laboratório, a septicemia resultou em perda aproximada de 40% da proteína total e redução na taxa de síntese protéica. Caso a nutrição não esteja adequada o crescimento do bezerro e a funcionalidade do sistema imune serão afetados negativamente. O uso do leite de descarte na alimentação dos bezerros pode ser um fator de risco para colonização da faringe por *M. bovis*. A pasteurização deste leite tem mostrado redução das bactérias associadas as doenças respiratórias porém com o colostro, o uso deste manejo ainda permanece controverso (GORDEN; PLUMMER, 2010).

2.8 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Os dados sobre o impacto econômico da CDRB são limitados. Este complexo de doenças é relatado como a principal causa de perdas financeiras devido a doenças infecciosas em bezerros. Custos com tratamentos, mão de obra, serviços veterinários, aumento da mortalidade e do abate precoce com redução no valor da carcaça, redução no ganho de peso, aumento da idade ao primeiro parto e possível redução da produção de leite explicam como o impacto econômico da CDRB é importante (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; MAUNSELL; DONOVAN, 2009).

Uma estimativa relata que a doença representa 50% da mortalidade de bezerros e uma redução em torno de 7,2% no ganho de peso. Caso ocorra nos três primeiros meses de vida, isto poderá representar sérias consequências a longo prazo. Bezerras tratadas para pneumonia nos 3 primeiros meses de vida tem duas

vezes e meia mais chances de morrer após 90 dias de idade em relação a animais não tratados. Bezerras sadias durante este período inicial tem duas vezes mais chances de parir 6 meses antes de animais que apresentaram doença respiratória na fase jovem (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

No Reino Unido estima-se que mais de 1.9 milhões de animais são afetados anualmente por doenças respiratórias custando mais de 54 milhões de libras a indústria da carne e que em torno de 157 mil animais morrem anualmente ao custo de quase 100 milhões de libras. Extrapolando estes valores para mais de 90 milhões de bovinos na Europa, este valor pode chegar a 576 milhões de euros. Estima-se que o *M. bovis* é responsável por um terço a um quarto de todas as perdas por doenças respiratórias (NICHOLAS; AYLING, 2003; NICHOLAS, 2004). Esslemont e Kossaibati (1999) estimaram um custo médio de doença respiratória por novilha leiteira no Reino Unido em US\$ 61, baseados em 30% de morbidade e 5% de mortalidade (MAUNSELL; DONOVAN, 2009). Bureau et al. (2001) analisaram perdas econômicas em 909 bezerros Belgian Blue de 79 rebanhos com idade entre 15 e 60 dias causadas pelo CDRB na Bélgica. A perda média de todos os bezerros foi estimada em 23,35 euros, enquanto a perda individual por cada animal mórbido foi de 64,71 euros.

Nos Estados Unidos, o USDA (2011) informou um custo médio de 23,45 dólares por tratamento em rebanhos de corte que possuem confinamentos com mais de 1000 cabeças. Em uma estimativa conservadora, levando em conta o custo de um único tratamento e a perda de valor da carcaça, foi estimado uma perda de US\$ 253,97 por animal. A perda total da indústria de confinamentos chega a mais de US\$ 1 bilhão anualmente (WELSH et al., 2004; RICE et al., 2007; SING et al., 2011; USDA, 2011). Brodersen (2010) relatam perdas resultantes do CDRB variando entre US\$ 23,23 a 151,18 e que aproximadamente 32 milhões de animais morrem anualmente no Estados Unidos por este problema. Maunsell e Donovan (2009) relatam que em 1990 o custo de doenças respiratórias em rebanhos leiteiros do Michigan foi estimado em US\$ 14,71 por bezerra anualmente. Houe (2003) relatou em sua revisão que no Canadá surtos agudos de BVDV causou mortalidades média de 9% em animais adultos e 53% em animais abaixo de 2 anos tendo uma alta incidência de doenças respiratórias. Foram estimadas perdas de US\$ 70 mil em média por rebanho leiteiro afetado.

No Brasil, apesar de uma alta incidência de doenças respiratórias nos rebanhos bovinos, ainda não existem dados sobre custos atribuídos a ocorrência destas enfermidades (GONÇALVES, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento teve autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolado sob o nº2929/2013, aprovado em reunião de 08/04/2015. Foram considerados todos os princípios éticos e morais de experimentação animal na condução deste trabalho.

Foram utilizados um total de 96 bovinos leiteiros machos e fêmeas jovens e adultos examinados entre os meses de agosto e novembro de 2014. Os animais eram provenientes de propriedades leiteiras localizadas nos municípios de Bragança Paulista e Mococa no estado de São Paulo. Todos foram examinados segundo Rosenberger (1983) e os dados obtidos foram compilados em ficha clínica específica para análise posterior (Figura 1).

Os animais foram escolhidos de forma aleatória sem levar em consideração se eram animais sadios ou doentes com broncopneumonia. Para definição e formação dos grupos foram considerados positivos os animais que apresentaram pelo menos 2 dos seguintes parâmetros como referência: temperatura retal acima de 39,5°C, secreção nasal mucopurulenta ou purulenta, tosse com reflexo positivo, estertores ou crepitação na auscultação pulmonar e movimentos respiratórios acima de 40 por minutos (BENESI et al., 2013).

Figura 1 - Ficha clínica utilizada no estudo

FICHA DE EXAME DO TRATO RESPIRATÓRIO		
IDENTIFICAÇÃO:	RAÇA:	IDADE:
PROPRIETÁRIO:	SEXO: ☐ 1 - F ☐ 2 - M	
PROPRIEDADE:	MUNICÍPIO:	
EXAME CLÍNICO GERAL		
ESCORE CORPORAL: ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10		
STATUS HIDRICO: ☐ 1-NORMAL ☐ 2-LEVE ☐ 3-MODERADA ☐ 4-GRAVE		DURAÇÃO DA DOENÇA: ☐ 1 - AGUDA ☐ 2 - CRÔNICA
ATITUDE GERAL: ☐ 1-NORMAL ☐ 2-APÁTICO ☐ 3-CAMBALEANTE ☐ 4-HIPERESTÉSICO ☐ 5-IMÓVEL ☐ 6-DECÚBITO		
T: <input type="text"/> °C	FR: <input type="text"/> mrpm	FC: <input type="text"/> bpm
TPC: <input type="text"/> seg		
MUCOSAS: ☐ 1-RÓSEA ☐ 2-ROSA PÁLIDA ☐ 3-PÁLIDA ☐ 4-CONGESTA ☐ 5-HIPERÉMICA ☐ 6-ICTÉRICA ☐ 7-CIANÓTICA		
ALIMENTAÇÃO: ☐ 1-PASTO ☐ 2-CAPIM PICADO ☐ 3-CANA ☐ 4-SILO ☐ 5-CONCENTRADO		
☐ 6- SILAGEM DE GRAO UMIDO ☐ 7-MINERAL ☐ 8-CEVADA ☐ 9-FENO		
EXAME CLÍNICO ESPECÍFICO		
SIMETRIA DO AR: ☐ 1- SIM ☐ 2- NÃO		PALPAÇÃO: <input type="text"/>
ODOR NASAL: ☐ 1- ACETONA ☐ 2- URINA ☐ 3- AMÊNDOA ☐ 4- ESSÊNCIA ☐ 5- PÚTRIDO		PERCUSSÃO: <input type="text"/>
EXAME DO FLUXO NASAL		
QUANTIDADE DE SECREÇÃO: ☐ 1-NULA ☐ 2- POUCA ☐ 3- ABUNDANTE		
TIPO DE SECREÇÃO: ☐ 1-SEROSA ☐ 2-MUCOSA ☐ 3-SANGUINOLENTA ☐ 4-PURULENTA ☐ 5-ESPUMOSA		
EXAME DAS FOSSAS NASAIS E ACESSÓRIAS		
INSPEÇÃO EXTERNA: ☐ 1- ABERTURA ☐ 2- SIMETRIA ☐ 3- SALIÊNCIAS E REENTRÂNCIAS		
INSPEÇÃO INTERNA: ☐ 1- SIMETRIA ☐ 2- DEFORMAÇÕES E HIPERTROFIAS ☐ 3- CORPO ESTRANHO		
EXAME DO TORAX		
MOVIMENTOS RESPIRATÓRIOS: ☐ 1- ABDOMINAIS ☐ 2- TORÁDICOS ☐ 3- TORÁCICO-ABDOMINAL		
☐ 4- PROFUNDO ☐ 5- MEDIANO ☐ 6- SUPERFICIAL		
PERCUSSÃO: ☐ 1- MACIÇO ☐ 2- PING ☐ 3- TIMPÂNICO ☐ 4- METÁLICO ☐ 5- CLARO		
AUSCULTAÇÃO: ☐ 1- CREPITAÇÃO FINA ☐ 2- ESTERTOR ÚMIDO ☐ 3- RONCO ☐ 4- SIBILO ☐ 5- ÁREA DE SILÊNCIO		
☐ 6- RUÍDO TRAQUEO-BRÔNQUICO ☐ 7- RUÍDO BRONQUIO-BRONQUIOLAR ☐ 8- PROPAGAÇÃO CARDIACA		
<div style="text-align: center;"> </div>		
OBSERVAÇÕES:		

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

3.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico das amostras, foram realizados o cultivo bacteriano para *P. multocida*, *M. haemolytica*, no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) FMVZ/USP; isolamento e identificação de *Mycoplasma* spp. Laboratório de Micoplasma do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e soro-neutralização para detectar anticorpos contra os BoVH-1, BVDB e VSRB no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico.

3.2 COLETA DO MATERIAL

O sangue total dos animais foi coletado por venopunção da veia jugular externa, após processo de desinfecção do local, utilizando tubo seco com ativador de coágulo a base de sílica no volume de 10 mL com agulha descartável 21G. Após colhidas, as amostras foram mantidas refrigeradas e posteriormente centrifugadas a 3.000g durante 15 minutos. O soro obtido foi transferido para microtubos de 2,0 mL e estocados em freezer -20 °C até o seu processamento para anticorpos virais.

Para obtenção do lavado traqueobrônquico os animais foram contidos em estação e a cabeça distendida com posterior tricotomia e assepsia da região de acesso entre terço médio e o terço inferior da traqueia (Figura 2). O acesso ao trato respiratório inferior foi realizado utilizando um cateter do tipo venoso central 16G x 12" (1,7mm x 30,4cm). Logo após, foram instilados 20 mL de solução fisiológica 0,9%, com posterior recuperação do lavado (Figura 3). Parte do lavado foi acondicionado em uma zaragatoa (swab) com meio tipo "Stuart" para cultivo de *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* e o restante do material foi acondicionado em criotubo contendo meio de transporte para micoplasma e glicerol, e congeladas imediatamente após em nitrogênio líquido, até o momento do processamento para micoplasma. O meio de transporte para micoplasma continha 8 g de sacarose, 0,2 g de fosfato de sódio monobásico, 0,4 g de fosfato de sódio

dibásico, 10 mL de soro equino, 100 μ L de penicilina e 1 mL de acetato de tálio. O criotubo de transporte continha partes iguais do meio de transporte e glicerol.

Figura 2 - Animal contido pronto para ser acessado para obtenção do lavado

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

Figura 3 - Lavado Traqueobrônquico obtido após os procedimentos

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do material genético das amostras foi realizado no lavado traqueobrônquico adaptando método descrito por Fan, Kleven e Jackwood (1995). Foi utilizado o método de extração por fervura onde inicialmente as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos com posterior lavagem do sedimento com 200 µL de PBS e nova centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. A lavagem e a centrifugação foram novamente repetidos e após a centrifugação o pellet resultante foi suspenso em 20 µL de PBS. Este material foi então colocado em “banho maria” a 100°C por 10 minutos e logo em seguida resfriado em gelo por 5 minutos com posterior centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi então colhido, acondicionado em microtubo e estocado a -20°C.

3.4 CULTIVO E ISOLAMENTO DE MICOPLASMA

As amostras provenientes dos lavados foram cultivadas em meio SP4 específico para *Mycoplasma sp* e *Ureaplasma sp*.

Meio Líquido/Sólido SP4

Triptona.....	10,0 g
Peptona.....	5,3 g
Mycoplasma Broth Base	3,5 g
Água destilada	750 mL

Ajustar o pH entre 7,2 a 7,5

Para o preparo do meio sólido, acrescentar 10 g de ágar purificado;

Autoclavar a 121°C por 20 minutos;

Assepticamente, acrescentar ao meio autoclavado:

Soro equino.....	180 mL
CRML	50 mL
Extrato fresco de levedura 25%	35 mL
Glicose 10%	10 mL
Arginina	1 mL
Yeastolate	10 mL
Vermelho de Fenol 0,5%	4 mL
Penicilina 100.000 U/mL	1 mL
Acetato de Tálcio 1%	10 mL
Fonte: (TULLY, 1995)	

Uma alíquota de 200 µL da amostra foi inoculada em meio SP4 líquido, para se obter uma diluição de 10^{-1} , e 100 µL desta foi semeado no meio sólido SP4. A incubação ocorreu em aerofilia a 37 °C sendo observada durante 15 dias. A identificação de amostras positivas foi realizada através da hidrólise da arginina e da fermentação da glicose, observadas pela mudança de cor indicador de pH do meio líquido (vermelho de fenol) e através da visualização de colônias com a característica forma de “ovo frito” no meio sólido. Os isolados foram confirmados através da realização de PCR.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMA POR PCR

3.5.1 PCR da classe *mollicutes*

Primers previamente conhecidos (Quadro 1), descritos em 1996 por Van Kuppeveld et al. foram utilizados pela sua complementariedade as sequências conservadas do gene 16S do rRNA dos gêneros que pertencem a classe dos *mollicutes*. Após esta triagem inicial, amostras positivas também foram testadas para *M. dispar*, *M. bovis* e *M. mycoides subsp mycoides* SC.

Quadro 1 - Sequências de oligonucleotídeos específicos para *Mollicutes* e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Primers para mollicutes	Tamanho do produto
MGSO	5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3	270 pb
GPO3	5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3	

Fonte: Van Kuppeveld et al. (1996)

O conteúdo da reação no volume de 50 µL a ser utilizado na reação preparou-se o seguinte conteúdo: 15,6 µL de água destilada; 2,5 µL de tampão, 1,0 µL de MgCl₂, 4,0 µL de deoxiribonucleotídeos (dNTP), 0,4 µL de primers e 0,1 µL de Taq DNA polimerase. Com poucas adaptações ao que foi descrito por Van Kuppeld et al. (1992) foram utilizados os seguintes ciclos no termociclador para amplificação: primeiro ciclo de 5 minutos a 94°C, 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, seguido de 30 segundos a 57,7°C e 30 segundos a 72°C e 1 ciclo final de 10 minutos a 72°C. O material foi então refrigerado a 4°C até realizar-se a eletroforese.

3.5.2 PCR específico para *M. dispar*

Primers previamente conhecidos (Quadro 2), e que são complementares as sequências conservadas do gene 16S do rRNA específico para *M. dispar* foram utilizadas. PCR foi realizado nas amostras positivas para *mollicutes*.

Quadro 2 - Primer específicos para *M. dispar* e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Primers para mollicutes	Tamanho do produto
MDF	5'-TTA AAG CTC CAC CAA AAA -3	433 pb
MDR	5'-GTA TCT AAA GCG GAC TAA A -3	

Fonte: Van Kuppeveld et al. (1996)

Para se obter um volume de 50 µL a ser utilizado na reação preparou-se o seguinte conteúdo: 38,6 µL de água destilada; 5,0 µL de tampão, 2,0 µL de MgCl₂, 1,0 µL de deoxiribonucleotídeos (dNTP), 1,0 µL de primers, 0,4 µL de Taq

polimerase e 1,0 µL de DNA. Foram utilizados os seguintes ciclos no termociclador para amplificação: 1º ciclo de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; seguido de 30 segundos a 53,6°C; 30 segundos a 72°C e 1 ciclo final de 10 minutos a 72°C. O material foi então refrigerado a 4°C até o momento eletroforese.

3.5.3 PCR específico para *M. bovis*

Oligonucleotídeos iniciadores conhecidos (Quadro 3), e que se complementam as sequências conservadas do gene 16S do rRNA específico para *M. bovis* foram utilizadas. PCR foi realizado nas amostras positivas para *mollicutes*.

Quadro 3 - Primer específicos para *M. bovis* e tamanho da amplificação

Iniciadores	Primers para mollicutes	Tamanho do produto
MboF	5'-CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG-3	360 pb
MboR	5'-CCG TCA AGG TAG CAT CAT TCC CTA T -3	

Fonte: Van Kuppeveld et al. (1996)

Para se obter um volume de 50 µL a ser utilizado na reação preparou-se o seguinte conteúdo: 35,1 µL de água destilada; 5,0 µL de tampão, 1,5 µL de MgCl₂, 1,0 µL de deoxiribonucleotídeos (dNTP), 1,0 µL de primers, 0,4 µL de Taq polimerase e 5,0 µL de DNA. Os seguintes ciclos no termociclador foram utilizados para amplificação: 1º ciclo de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C; seguido de 1 minuto a 55°C; 2 minutos a 72°C e 1 ciclo final de 10 minutos a 72°C. O material foi então refrigerado a 4°C até o momento eletroforese.

3.5.4 PCR específico para *M. mycoides subsp mycoides*

Uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores conhecidos (Quadro 4), e que são complementares as sequências conservadas do gene 16S do rRNA

específico para *M. mycoides subsp mycoides* foram utilizadas. PCR foi realizado nas amostras positivas para *mollicutes*.

Quadro 4 - Primer específicos para *M. mycoides subsp mycoides* e tamanho amplificado

Iniciadores	Primers para mollicutes	Tamanho do produto
MboF	5'-ATA CTT CTG TTG TAG TAA TAT G -3	207 pb
MboR	5'-CTG ATT ATG ATG ACA GTG GTC A -3	

Fonte: Van Kuppeveld et al. (1996)

Para se obter um mix com volume de 50 µL para a reação preparou-se o seguinte conteúdo: 38,3 µL de água destilada; 5,0 µL de tampão, 1,5 µL de MgCl₂, 1,0 µL de deoxiribonucleotídeos (dNTP), 1,0 µL de primers, 0,2 µL de Taq polimerase e 2,0 µL de DNA. Na amplificação os seguintes ciclos no termociclador foram utilizados: 40 ciclos de 1 minuto a 92°C; seguido de 1 minuto a 53°C; 2 minutos a 72°C e 5 ciclos finais de 5 minutos a 72°C. O material foi então refrigerado a 4°C até o momento eletroforese.

3.5.5 Detecção da amostra amplificada

Todos os produtos finais amplificados pelas PCRs foram separados, em gel de agarose 1% em 100 mL de tampão tris-acetato-EDTA (TAE) com adição posterior 100 µL de brometo de etídeo, por eletroforese.

3.6 VÍRUS NEUTRALIZAÇÃO (VN) PARA BVDV, BOHV-1 E VSRB

3.6.1 VN para BVDV

Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 cavidades de fundo chato. A coluna um da placa teste foi destinada para o controle de células, a coluna dois para

controle da toxicidade de cada soro e nas colunas três até 12, as amostras foram diluídas em série, na base logarítmica 2, a partir da diluição 1:10 até 1:5120, utilizando-se meio MEM. Para validação da prova foi incluído um “pool” de soros como controle negativo e positivo com títulos de anticorpos conhecidos. Feita a diluição das amostras, foi adicionada à placa 2000 DICT₅₀/mL do vírus, exceto no controle de células e de soro.

Uma placa controle de DICT₅₀ (de 1,98 a 1000 DICT₅₀/mL) e um placa para retitulação do mesmo vírus utilizado na diluição das doses infectantes, em ambas as placas as colunas 11 e 12 serviram como controle negativo, recebendo somente meio MEM.

As placas foram incubadas por uma hora em estufa 37°C com 5% de CO₂, após esse período receberam 50µL de suspensão de células MDBK na concentração de 3×10^5 células/mL, em cada cavidade. A infectividade foi indicada pelo efeito citopático visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido, após quatro dias de incubação a +37°C e 5% de CO₂. O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade em ambas as cavidades de cada diluição, sendo a menor diluição detectada pela prova 1:10, e o resultado foi expresso em log₁₀. O teste foi validado através do controle de células, do controle de soros, do resultado dos soros controle, doses de vírus e da retotitulação, pelo método de Reed e Muench (1938).

3.6.2 VN para BoHV-1

Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 cavidades de fundo chato. A coluna um da placa teste foi destinada para o controle de células, a coluna dois para controle da toxicidade de cada soro e nas colunas três até 12, as amostras foram diluídas em série, na base logarítmica 2, a partir da diluição 1:2 até 1:1024, utilizando-se meio MEM. Para validação da prova foi incluído um “pool” de soros como controle negativo e positivo com títulos de anticorpos conhecidos. Feita a diluição das amostras, foi adicionada à placa 2000 DICT₅₀/mL do vírus, exceto no controle de células e de soro.

Uma placa controle de DICT₅₀ (de 1,98 a 1000 DICT₅₀/mL) e um placa para retitulação do mesmo vírus utilizado na diluição das doses infectantes, em ambas as placas as colunas 11 e 12 serviram como controle negativo, recebendo somente meio MEM.

As placas foram incubadas por uma 24 horas em estufa 37°C com 5% de CO₂, após esse período receberam 100µL de suspensão de células MDBK na concentração de 3×10^5 células/mL, em cada cavidade. A infectividade foi indicada pelo efeito citopático visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido, após quatro dias de incubação a +37°C e 5% de CO₂. O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade em ambas as cavidades de cada diluição, sendo a menor diluição detectada pela prova 1:2, e o resultado foi expresso em log₁₀. O teste foi validado através do controle de células, do controle de soros, do resultado dos soros controle, doses de vírus e da retitulação, pelo método de Reed e Muench (1938).

3.6.3 VN para VSRB

Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 cavidades de fundo chato. A coluna um da placa teste foi destinada para o controle de células, a coluna dois para controle da toxicidade de cada soro e nas colunas três até 12, as amostras foram diluídas em série, na base logarítmica 2, a partir da diluição 1:2 até 1:1024, utilizando-se meio MEM. Para validação da prova foi incluído um “pool” de soros como controle negativo e positivo com títulos de anticorpos conhecidos. Feita a diluição das amostras, foi adicionada à placa 2000 DICT₅₀/mL do vírus, exceto no controle de células e de soro.

Uma placa controle de DICT₅₀ (de 1,98 a 1000 DICT₅₀/mL) e um placa para retitulação do mesmo vírus utilizado na diluição das doses infectantes, em ambas as placas as colunas 11 e 12 serviram como controle negativo, recebendo somente meio MEM.

As placas foram incubadas por uma hora em estufa 37°C com 5% de CO₂, após esse período receberam 100µL de suspensão de células MDBK na

concentração de 3×10^5 células/mL, em cada cavidade. A infectividade foi indicada pelo efeito citopático visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido, após quatro dias de incubação a $+37^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2 . O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade em ambas as cavidades de cada diluição, sendo a menor diluição detectada pela prova 1:2, e o resultado foi expresso em $\log_{10}$. O teste foi validado através do controle de células, do controle de soros, do resultado dos soros controle, doses de vírus e da retrotitulação, pelo método de Reed e Muench (1938).

3.7 CULTIVO E ISOLAMENTO DE *P. MULTOCIDA* E *M. HAEMOLYTICA*

As zaragatoas contendo conteúdo do lavado traqueobrônquico foram transportadas refrigeradas até o laboratório. As amostras foram inicialmente inoculadas em caldo BHI (Brain and heart infusion broth) com incubação a 37°C por 24 horas. Paralelamente foram semeadas em ágar sangue e ágar MacConkey, com incubação em aerobiose a 37°C com leituras em 24-48 horas. As amostras cultivadas em caldo BHI foram posteriormente semeadas em ágar sangue e ágar MacConkey, com incubação destas realizada de forma similar à descrita anteriormente para o cultivo inicial.

As bactérias isoladas que apresentaram aspectos fenotípicos característicos de *Pasteurella multocida* foram identificadas e classificadas de acordo com Murray et al. (1999) e Quinn et al. (2005).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados laboratoriais para classe *Mollicutes*, *Micoplasmas sp*, cultivo bacteriano, e vírus neutralização foram determinados e expressos tanto em frequências relativas e absolutas.

Para verificação de influência na ausência ou presença de broncopneumonia, foi realizado um delineamento inteiramente casualizado tendo como variável predita

a presença ou a ausência de broncopneumonia, de acordo com Benesi et al. (2013), e as variáveis preditoras utilizadas foram todos os sinais clínicos presentes na ficha clínica e os agentes encontrados. No primeiro estágio, utilizou-se inicialmente o teste de qui-quadrado para se determinar quais variáveis preditoras tinham influência na presença da doença.

Após, foram selecionadas as variáveis significativas para serem utilizadas em um segundo momento onde foi realizada uma regressão logística com objetivo de selecionarmos quais eram aquelas variáveis realmente significativas na presença das demais. Devido ao grande número de variáveis que entraram no modelo, foi utilizado o método Forward onde as variáveis foram incluídas uma de cada vez dentro do modelo, começando pelas que foram menos significativas até aquelas que foram significativas com $p < 0,10$. Foi utilizado o software SPSS versão 19.0.

4 RESULTADOS

Os resultados serão mostrados de acordo com os achados laboratoriais, e ao final é apresentada a análise estatística descritiva e analítica dos resultados.

4.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA

4.1.1 Cultivo e isolamento de *Mycoplasma sp*

Houve isolamento de Micoplasmas em 12 das 96 (12,5%) amostras (Figura 4).

Figura 4 - Colônia de micoplasma com sua forma característica de “ovo frito”

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

4.2.1 Identificação de *Mycoplasma* sp por PCR

4.2.1.1 PCR da classe *Mollicutes*

Das 96 amostras analisadas (Figura 5), 68 (70,83%) apresentaram resultados positivos, sendo 47 animais sadios e 21 animais com broncopneumonia. Em 40 amostras positivas para *Mollicutes* houve identificação da espécie com os primers utilizados.

Figura 5 - Análise PCR para classe *mollicutes*. Amostras 1, 4, 6, 7, 11 e 12 positivas e amostra 14 como controle

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

4.2.1.2 PCR específico para *M. dispar*

Das amostras positivas para a classe *Mollicutes*, 26/68 (27%) foram confirmadas como *M. dispar* sendo, 18 em animais sadios e 8 em animais doentes com broncopneumonia, das 96 amostras analisadas (Figura 6).

Figura 6 - Resultado da PCR para *M. dispar*. Amostras positivas nos números 1, 2, 4, 8, 9 e 10 sendo o número 15 o controle

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

4.2.1.3 PCR específico para *M. bovis*

Apenas 2/68 animais (2%) foram identificados como positivo para *M. bovis* sendo 1 animal doente e o outro sadio (Figura 7).

Figura 7 - Resultado *M. bovis* na análise de PCR. Amostras 5 e 13 positivas.

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

4.2.1.4 PCR específico para *M. mycoides* subsp. *mycoides*

Nenhuma das 68 amostras foi identificada para *M. mycoides* subsp *mycoides* (Figura 8).

Figura 8 - Resultado negativo para *M. mycoides* subsp *mycoides*, ficando somente o controle (13) marcado

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

4.3.1 Vírus Neutralização (VN) para BVDV, BoHV-1 e VSRB

4.3.1.1 VN para BVDV

As 56 amostras analisadas para BVDV apresentaram 31 (55,35) reagentes, das quais 22 foram em animais sadios e 9 em animais doentes.

4.3.1.2 VN para BoVH-1

Das 57 amostras de soro, 35 (61,40%) foram reagentes para BoVH-1, dos quais 12 animais estavam com broncopneumonia e 23 animais saudáveis.

4.3.1.3 VN para VSRB

Para o VSRB, foram analisadas 58 amostras, das quais 54 (93,10%) foram reagentes. Neste caso, 35 eram de animais sadios e 19 de animais com problemas respiratórios.

4.4.1 Cultivo e isolamento de *P. multocida* e *M. haemolytica*

O cultivo de *Pasteurella* spp. foi realizado em 68 amostras dos quais 11 (16,17%) apresentaram resultado positivo para *P. multocida* sendo 5 em animais sadios e 6 em animais com broncopneumonia. Várias outras espécies de bactérias também foram encontradas nos lavados analisados conforme relatado a seguir: *Bacillus* sp. 7 amostras (10,29 %), *Staphylococcus* sp. 14 amostras (20,59%), *Escherichia coli* 3 amostras (4,41%), *Klebsiella oxytoca* 3 amostras (4,41%), *Pseudomonas aeruginosa* 3 amostras (4,41%), *Klebsiella pneumoniae* 1 amostra (1,47%) e ausência de crescimento em 26 (38,26%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Bactérias encontradas durante cultivo e isolamento de *Pasteurella spp.*

Fonte: Dias de Oliveira (2015)

4.5 ESTATÍSTICA ANALÍTICA

Para análise analítica, utilizou-se, primeiramente, o teste qui-quadrado para verificar a existência de associação entre as variáveis, ao nível de significância de 10%.

Inicialmente, investigou-se a associação entre a presença da broncopneumonia e a identificação dos agentes associados a esta condição. Observou-se associação entre os animais doentes e a presença de *Pasteurella multocida* e o vírus da diarreia viral bovina ($p < 0,1$), como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Associação entre a saúde dos animais e a presença de *Mollicutes*, *M. díspar*, *M. bovis*, *P. multocida*, BoVH, BVDV e VSRB em lavado traqueo-brônquico - São Paulo - 2015

Agentes	N	%	p-valor
<i>Mollicutes</i>	68/96	71,00	0,904
<i>M. díspar</i>	26/96	27,10	0,951
<i>M. bovis</i>	2/96	02,10	0,563
<i>P. multocida</i>	11/96	11,46	0,076
BovH-1	35/57	61,40	0,399
BVDV	31/57	55,35	0,080
BRSV	54/57	93,10	0,113

Nível de significância: 10%.

Pelos dados apresentados na tabela abaixo, sugere-se que a raça holandesa é mais susceptível a broncopneumonia. Não foi observada associação entre as variáveis idade e saúde dos animais (Tabela 2).

Tabela 2 - Associação da broncopneumonia com as variáveis idade e raça - São Paulo - 2015

Variáveis	Categoria	Saúde dos animais				Total		p-valor
		Sadio		Doente				
		N	%	N	%	N	%	
Raça	SRD	27	28	7	7	34	35	0,095
	Holandesa	39	41	23	24	62	65	
	Total	66	69	30	31	96	100	
Idade	> 12 meses	12	12,5	2	2	14	14,5	0,138
	< 12 meses	54	57	28	29,5	82	86,5	
	Total	66	69,5	30	31,5	96	101	

Nível de significância:10%

Observou-se associação entre idade e a presença de bactérias da classe *Mollicutes*, como demonstrado na Tabela 3 (OR: 4,1; IC: 1,27-13,34).

Tabela 3 - Associação entre a idade dos animais e a presença de *Mollicutes* no lavado traqueobrônquico de bovinos examinados - São Paulo - 2015

Idade	<i>Mollicutes</i>				Total		p-valor
	Presente		Ausente				
	N	%	N	%	N	%	
> 12 meses	8	8,33	6	6,25	14	14,58	0,0177
< 12 meses	20	20,83	62	64,58	82	85,42	
Total	28	29,16	68	70,83	96	100	

Nível de significância:10%.

Ao compararmos os animais que apresentavam bactérias da classe *Mollicutes* com as diversas manifestações apresentadas pelos animais examinados, observou-se associação entre a presença destas bactérias e o som submaciço à percussão do gradil torácico (Tabela 4).

Tabela 4 - Associação entre a ausência de *Mollicutes* e o som submácio à percussão do gradil torácico dos bovinos examinados - São Paulo - 2015

Submaçico	<i>Mollicutes</i>				Total		p-valor
	Presente		Ausente		N	%	
	N	%	N	%			
Presente	1	1,49	4	5,97	5	7,46	0,025
Ausente	43	64,18	19	28,36	62	92,54	
Total	44	65,67	23	34,33	67	100	

Nível de significância:10%.

De acordo com a Tabela 5 notou-se que há associação entre a presença de *M. díspar* e alterações na ausculta pulmonar como sibilo e estertor úmido no pulmão. A chance de ocorrer estertor úmido e sibilo em animais acometidos por *M. díspar* é de 1,8 maior do que aqueles que não eram infectados por *M. díspar*.

Tabela 5 - Associação entre alterações na ausculta pulmonar e a ausência *M. díspar* no lavado traqueobrônquico - São Paulo - 2015

Variável	M. díspar				Total		p-valor
	Presente		Ausente		N	%	
	N	%	N	%			
Sibilo							
Presente	20	22,73	63	71,59	83	94,32	0,076
Ausente	3	3,41	2	2,27	5	5,68	
Total	23	26,14	65	73,86	88	100	
Estertor úmido							
Presente	14	15,91	53	60,23	67	76,14	0,046
Ausente	9	10,23	12	13,64	21	23,87	
Total	23	26,14	65	73,87	88	100	

Nível de significância:10%.

A presença de *P. multocida* foi associada a tosse nos animais examinados enquanto a sua ausência foi associada a secreção nasal mucopurulenta e mucosa, som submácio, crepitação fina, estertor úmido (Tabela 6). Houve uma chance maior de 5,5 vezes de apresentar tosse na presença de *P. multocida* enquanto na

sua ausência há uma maior chance dos animais apresentarem secreção mucosa (7,3) e mucopurulento (5,8), sem submaciço (9,6), crepitação fina (13) e estertor úmido (5).

Tabela 6 - Associação entre a presença no caso da tosse e a ausência nas outras manifestações, de *Pasteurella multocida* nos bovinos examinados - São Paulo – 2015

Tabela 2010							(Continua)
Variável	<i>P. multocida</i>				Total		p-valor
	Presente		Ausente				
	N	%	N	%	N	%	
Tosse							
Presente	3	3,23	6	6,45	9	9,68	0,035
Ausente	7	7,53	77	82,8	84	90,33	
Total	10	10,76	83	89,25	93	100	
Mucopurulento							
Presente	9	10,84	4	4,8	13	15,64	0,0215
Ausente	66	79,5	4	4,8	70	84,3	
Total	75	90,34	8	9,6	83	100	
Mucoso							
Presente	4	4,88	2	2,44	6	7,32	0,068
Ausente	70	85,73	6	7,32	76	93,05	
Total	74	90,61	8	9,76	82	100	

Variável							(Conclusão)
	<i>P. multocida</i>				Total		p-valor
	Presente		Ausente				
	N	%	N	%	N	%	
Submaciço							
Presente	3	4,48	2	2,99	5	7,47	
Ausente	58	86,57	4	5,97	62	92,54	0,031
Total	61	91,05	6	8,96	67	100	
Crepitação fina							
Presente	30	34,09	6	6,82	36	40,91	
Ausente	50	56,82	2	2,27	52	59,09	0,058
Total	80	90,91	8	9,09	88	100	
Estertor úmido							
Presente	15	17,04	6	6,81	21	23,85	
Ausente	65	73,86	2	2,27	67	76,13	0,003
Total	80	90,9	8	9,08	88	100	

Nível de significância:10%.

Observou-se associação entre a ausência de *M. bovis* e a presença de som claro à percussão do gradil torácico (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação entre a ausência de *M. bovis* e a presença de som claro a percussão do gradil torácico dos bovinos examinados - São Paulo - 2015

Claro	<i>M. bovis</i>				Total		p-valor
	Presente		Ausente				
	N	%	N	%	N	%	
Presente	0	0	58	88	58	88	0,007
Ausente	1	1,5	7	10,5	8	12	
Total	1	1,5	65	98,5	66	100	

Nível de significância:10%.

5 DISCUSSÃO

As doenças respiratórias são consideradas um sério problema de sanidade, levando a problemas de ordem econômica devido aos altos índices de morbidade (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002) e mortalidade, sendo responsáveis por 10 a 40% das mortes nos animais adultos (VIEIRA et al., 1993) e por 17% das mortes durante o período perinatal (ROOK et al., 1990).

Neste trabalho foi observado que as pneumonias são mais frequentes em animais jovens, pois estudou-se bezerros e adultos. Este resultado concorda com Ames (1997); Crowe (2001); Hartel et al. (2004) e Benesi et al. (2013). É importante ressaltar que a falha da transferência de imunidade passiva (BENESI et al., 2013) nos neonatos deve ser controlada para que se evite a instalação desta enfermidade.

Segundo Jong et al. (2014) os agentes etiológicos mais prevalentes na broncopneumonia são *M. haemolytica*, *P. multocida* e *Mycoplasma* spp. No presente estudo não se encontrou a presença *M. haemolytica*, discordando com os achados deste autor, porém foi isolado Mollicutes e entre eles o *M. díspar* e o *M. bovis*, não foi observado a presença de *M. mycoides subsp. mycoides*. Jong et al. (2014) defende que estes microorganismos colonizam o trato respiratório anterior de animais saudáveis, afirma que há uma relação de comensalismo e que uma quebra de resistência imunológica poderá levá-los a provocar a broncopneumonia. Ayling et al. (2011), isolaram diferentes espécies de *micoplasmas* causando broncopneumonia. Na Grã-Bretanha entre 1990 e 2000 o *M. bovirhinis* foi o microrganismo mais comumente isolado apresentando uma prevalência de 28%. *M. bovis* estava presente em 22% das 8.959 amostras analisadas. Nos Estados Unidos, há também uma frequência maior de *M. bovirhinis* seguido pelo *M. bovis* (NAHMS, 2002). Neste estudo não foi pesquisado *M. bovirhinis*, e o *M. díspar* ocorreu mais do que o *M. bovis*, resultado este semelhante aos encontrados por Nikunen et al. (2007) na Finlândia. Supõe-se que condições de manejo e alimentação nestes dois países podem propiciar o crescimento de diferentes espécies de micoplasmas no trato respiratório nos bovinos. Na França, Le Grand et al. (2002); Valacher e Hagglund (2006) e Arcangioli et al. (2008) e no Canadá demonstraram a importância do *M. bovis* em quase todos os rebanhos estudados, sendo esta espécie de micoplasma a mais prevalente também, este fato pode ser analisado devido a proximidade cultural

e histórica entre estes dois países, onde há a importação e exportação de animais entre si que propiciam a semelhança deste quadro bacteriológico. Na Holanda, Irlanda, Bélgica e Egito, este quadro se repete segundo os autores a seguir: Ter Laak, Wentink e Zimmer (1992); Nicholas (2004); Ghoneim et al. (2010) e Pardon et al. (2011).

Na Dinamarca, Kusiluka et al. (2000) encontraram outro perfil de espécies de micoplasmas causadores de broncopneumonia pois o *Ureaplasma* spp. foi predominante em 72% das amostras seguido pelo *M. díspar* (48%), *M. bovis* (24%), *M. bovirhinis* (20%) e *M. bovirhinalium* (6%).

Ghoneim et al. (2010) no Egito recuperaram de swabs nasais *Mycoplasma* spp. em 46,67% dos bezerros pneumônicos enquanto a taxa nos animais sadios resultaram 32% de amostras positivas. O *M. bovis* foi o de maior prevalência seguido pelo *M. díspar*. As infecções mistas prevaleceram em 12% das amostras, índice tido como relativamente alto. Associações do BVDV com *Mycoplasma* sp e também *M. haemolytica* com *Mycoplasma* sp foram de 9,33% e 8%.

Segundo Radostits, Blood e Gay (2002); Griffin et al. (2010) e de Jong et al. (2014) fatores de virulência como leucotoxinas, lipossacarídeos, adesinas e outras proteínas de membrana, podem atacar células de defesa do hospedeiro e assim facilitar sua colonização. Agentes virais que causam uma broncopneumonia viral também podem ser porta de entrada para bactérias causadores desta enfermidade (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011). Radostits, Blood e Gay (2002) relata a ocorrência de surtos do VSRB com infecção secundária por *P. multocida*, *S. pneumoniae* e *M. bovis*, descritos desde a década de 80 sendo este um dos agentes responsáveis por grandes perdas econômicas na bovinocultura mundial. Por exemplo, a infecção por BoHV-1 provoca danos ao epitélio respiratório prejudicando o mecanismo de defesa mucociliar que favorece a *M. haemolytica* para migrar para os pulmões, proliferar, elaborar os determinantes de virulência e causar doença. A infecção das células do sistema imunitário por o BVDV, a inibição da proliferação das células por o BVDV, BoHV-1, VSRB, e indução apoptose células T CD4 + por BoHV-1, comprometem a organização da resposta imune contra todos os patógenos. A indução de apoptose células CD4+Th por BoHV-1 prejudica a elaboração citocinas que promovem o desenvolvimento dos elementos efetores de respostas imunes humorais e mediadas por células. A regulação negativa da

expressão de MHC de classe I do BoHV-1 compromete o desenvolvimento da resposta de linfócitos T citotóxicos contra o BoHV-1, bem como o BVDV, VSRB e PI-3 (SRIKUMARAN; KELLING; AMBAGALA, 2008).

Radostits, Blood e Gay (2002) cita que os principais agentes virais causadores desta enfermidade são: vírus da diarreia bovina (BVDV), herpes vírus bovinos (BoHV-1), vírus respiratório sincicial bovino (VSRB) e vírus da parainfluenza (PI-3). No presente estudo houve alta porcentagem de animais sororeagentes para BVDV, BoHV-1 e VSRB sendo que não foi pesquisado o PI-3 devido à dificuldade de profissionais e laboratórios que realizem este exame no Brasil.

O Complexo de Doenças Respiratórias Bovinas (CDRB) representa grande parte do prejuízo econômico dentro da cadeia pecuária leiteira e de corte. Esta pesquisa traça um panorama brasileiro e paulista sobre esta enfermidade que ainda, na América Latina, assim como em diversos outros países é pouco estudada. Há uma dificuldade de se promover um estudo onde uma ampla gama de fatores externos e agentes causadores estejam envolvidos no desenvolvimento desta doença.

Apesar desta dificuldade, esta pesquisa, com dados inéditos ainda na literatura veterinária brasileira comprovou que a *Pasteurella multocida* é o agente principal da broncopneumonia em fazendas comerciais de leite estudadas, possuindo chance maior de 3,05 da presença deste agente como responsável pela instalação desta enfermidade.

Outros estudos como o de Viana et al. (2007) relatam em ovinos que além da *P. multocida*, a *M. haemolytica* possui uma influência grande nesta espécie. Benesi et al. 2013 publicou um outro perfil microbiológico em animais acometidos por broncopneumonia que foi: *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. e *Escherichia coli* o que prova que a localização, o tipo de criação e fatores de manejo podem ser determinantes para a instalação de diferentes patógenos causadores da mesma enfermidade.

Segundo Rizzo (2006), os micoplasmas estão presentes em diferentes mucosas de hospedeiros. São considerados patógenos primários ou oportunistas em alguns casos de broncopneumonia de bezerros (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; MAUNSELL et al., 2008). Segundo estes autores, várias espécies de micoplasmas são isolados de amostras provenientes de swabs e lavados

traqueobrônquicos e partes do pulmão. *Mycoplasma dispar*, *M. mycoides subsp. mycoides* small colony (SC), *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *M. bovis genitalium*, *M. arginini*, *M. canis* e *Ureaplasma spp.* estão presentes em vários relatos.

No presente estudo, foi estudado a ocorrência da broncopneumonia viral. Os anticorpos de VSRB, BVD e o BovH-1 foram pesquisados neste estudo e entre os três agentes o que ocorreu em maior frequência foi o VSRB. Vários países também possuem levantamentos sobre esta enfermidade apresentando também altas taxas de ocorrência, como na França, Valacher e Hagglund (2006). No Brasil houve estudos que comprovassem a presença desta enfermidade no Rio Grande do Sul, Driemeier et al. (1997) e em Alagoas, Peixoto et al. (2000). Em São Paulo, Affonso et al. (2012) relataram uma frequência média de 63% em três fazendas estudadas, o que mostrou que no estado há diferenças de frequências entre as regiões estudadas pois encontrou-se neste estudo uma frequência de 93,10%.

Alguns países europeus já conseguiram controlar a broncopneumonia causada pelo BoH-1 (RAAPERI et al., 2014). Mesmo assim muitos países ainda apresentam índices altos de animais sororeagentes como Estados Unidos, Estônia, Raapari (2012), Inglaterra e país de Gales, Paton et al. (1998), Bélgica, Boelaert et al. (2000), Itália, Rinaldi et al. (2007) Escócia, Msolla, Wiseman e Selman (1981); Espanha, Eiras et al. (2009) e Gonzalez-Garcia et al. (2009), Irlanda, Cowley et al. (2011) e Hungria, Tekes et al. (1999), Irã, Shirvani et al. (2012), Uruguai, Guarino et al. (2007), Venezuela, Obando et al. (1999), Equador, Carbonero et al. (2011), Peru, Stahl et al. (2002) e alguns países africanos. Os dados encontrados neste estudo estão de acordo com os encontrados por Jones e Chowdhury (2008), ao redor de 60%, resultado indicador que uma política de saneamento é necessária no Brasil para o controle desta enfermidade, através de vacinas produzidas com cepas isoladas no território nacional e de boa qualidade pois outros estados também encontraram esta frequência alta de animais sororeagentes ao BoH-1 como no Paraná, (DIAS et al., 2013), Rio Grande do Sul, Lovato et al. (1995) e Campos et al. (2009), Espírito Santo, Santos et al. (2014), na região Centro-Oeste do Brasil, (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005), na região Nordeste, no estado do Maranhão, (BEZERRA et al., 2012), no estado da Bahia, Cerqueira et al. (2000). Animais sororeagentes ao BovH-1 neste estudo foi o segundo de maior frequência seguido pelo BVDV.

Nesta pesquisa cerca de 55,35% animais foram sororeagentes para BVDV, dados que se assemelham aos encontrados no sudoeste da França (VALACHER; HAGGLUND, 2006), em Alberta e Saskatchewan no Canadá, Durham e Hassard (1990), na Inglaterra e no país de Gales, Paton et al. (1998), no Egito, Zaghawa (1997), no Irã, na Tailândia, Kampa et al. (2009), na região de Yucatan no México, Solis-Calderon, Segura-Correa e Segura-Correa (2005), São Paulo e Minas Gerais, Samara, Dias e Moreira (2004). O BVDV apesar de apresentar menor ocorrência entre os animais estudados nesta pesquisa, houve uma associação positiva entre a sua presença e a ocorrência de broncopneumonia (0,08, com $p < 0,1$). Este resultado demonstra que apesar da sua menor frequência nas fazendas pesquisadas oferece um maior risco para a instalação de um quadro respiratório.

Foi encontrado no presente estudo 11,46% de animais com isolamento de *Pasteurella multocida* e nenhum isolado para *M. haemolytica*. Nosso resultado prova que a *M. haemolytica* não é um agente importante causador de broncopneumonia bacteriana no Brasil nas fazendas estudadas, ao contrário do que foi encontrado em outros países como no Japão, Katsuda et al. (2007), nos Estados Unidos, Al-Ghamdi et al. (2000), México, Jaramillo-Arango et al. (2007), no continente africano, Zaher et al. (2014). No Brasil, em ovinos, Viana et al. (2007), ao contrário, encontrou animais com a presença de *M. haemolytica*, a diferença entre nosso estudo e o de Viana talvez seja devido a este autor ter isolado em diferente espécie, ovino, que deve ser mais sensível ao desenvolvimento desta bactéria.

Aos analisarmos as alterações encontradas no exame físico dos animais e a presença de bactérias ou vírus ou suas associações causando broncopneumonia obteve-se informações inéditas ainda na literatura brasileira. Nesta pesquisa houve a associação entre presença de *Mollicutes* no trato respiratório e alteração à percussão, pois nesses animais havia a presença maior de som submaciço. Também encontrou-se associação na presença de sibilo e estertor úmido em animais infectados por *M. díspar*. Estes resultados estão em desacordo com os encontrados por bezerros gnotobióticos ou seja, animais livres de patógenos específicos (LPE) como as cobaias de laboratório pois a inoculação endotraqueal de *Mycoplasma* spp. não resultou em alterações clínicas no exame físico porém no exame complementar histológico revelaram pneumonia em 2 a 3 semanas após a inoculação, logo o exame físico pode trazer informações importantes ao diagnóstico

da broncopneumonia mas dependerá da espécie de micoplasma envolvido e do animal estudado (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Nas broncopneumonias virais, em casos moderados, Radostits, Blood e Gay (2002) relatam a presença de tosse e polipnéia. Não foi encontrado, neste estudo, nenhuma relação entre a presença de soro-reagentes nas enfermidades virais estudadas e manifestações clínicas no exame físico, uma das causas dessa discordância é que não foi realizado o isolamento do agente neste estudo, e os animais soro-reagentes podem ter tido o contato com o agente e o desenvolvimento da doença em outro período da colheita da amostra.

O estabelecimento do diagnóstico clínico preciso e de forma rápida, levando em conta os achados clínicos e epidemiológicos da propriedade, é de fundamental importância para evitar que a doença se espalhe no rebanho. Deve-se ter em mente o objetivo de estabelecer um tratamento racional e econômico, principalmente se as vacas lactantes forem afetadas. Tratamentos em massa não resolve o problema e deverão ser analisados levando-se em contas as perdas financeiras envolvidas. De qualquer forma o manejo clínico do surto consistirá no tratamento dos casos aparentes e a escolha de medidas preventivas eficientes para evitar novos casos (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Gonçalves et al. (2001) comenta que a presença de toxemia, depressão, febre, anorexia e agalactia em vacas leiteiras indica uma infecção bacteriana primária ou secundária. Nos animais estudados nesta pesquisa não se encontrou sinais de febre, agalactia o que demonstra que a enfermidade apesar de causar danos na produção de leite, ela não é total, o que demonstra que pesquisas para avaliar a perda econômica em animais com broncopneumonia é importante para podermos avaliarmos o real prejuízo desta doença nos rebanhos de leite no Brasil.

Radostits, Blood e Gay (2002) demonstram que em casos de broncopneumonia há secreção nasal mucopurulenta bilateral e tosse produtiva. As crepitações são geralmente audíveis em todo pulmão e se apresentam de forma mais pronunciada nas porções ventrais pulmonares. Pode-se comparar esses achados com os resultados desta pesquisa para animais infectados por *P. multocida* pois obteve-se associação com as seguintes manifestações clínicas: tosse, secreção mucosa e mucopurulento, som submaciço, crepitação fina e estertor úmido. Radostits, Blood e Gay (2002) classificaram animais com infecção bacteriana como

forma secundária de broncopneumonia e afirma que estes casos tendem a ser mais graves com febre, dispnéia e toxemia. O autor encontrou em casos de *Pasteurella spp*, temperatura entre 41 a 41,5 °C com uma grande área pulmonar acometida, apresentando estertores úmidos e crepitação. Como citado anteriormente, esta pesquisa não encontrou associação entre *Pasteurella multocida* e febre, em desacordo com Radostits, Blood e Gay (2002), mas houve a presença de estertores úmidos o que reafirma os achados do autor acima. Radostits, Blood e Gay (2002) também afirmam ter encontrado na palpação do gradil costal presença de ruído pleural, o que demonstra a presença de casos de pleurisia em animais acometidos por essa bactéria, não foi encontrado este tipo de alteração neste estudo em animais que foram isolados a mesma bactéria.

Radostits, Blood e Gay (2002) relatam que a *Truoperella pyogenes* é um agente de broncopneumonia e que pode haver grandes áreas do parênquima consolidado e presença de grave toxemia e estertores úmidos. Não se encontrou, nesta pesquisa, casos de broncopneumonia por *Truoperella pyogenes*, logo, também não houve casos, apesar disso houve a presença de casos de som maciço, o que sempre esteve associado a presença de *Pasteurella multocida*, reafirmando que esta bactéria é a mais importante causadora de broncopneumonia em fazendas de leite no estado de São Paulo.

Benesi et al. (2013) classificaram em seu trabalho de determinação da microbiota traqueobrônquica de bezerros de até 1 mês de vida que eram doentes, com broncopneumonia, os bezerros que apresentassem pelo menos duas das manifestações a seguir listadas: temperatura retal acima de 39,5°C, secreção nasal mucopurulenta ou purulenta, tosse com reflexo positivo, estertores ou crepitação na auscultação pulmonar e aumento da frequência respiratória acima de 40 MR/min. Nesta pesquisa, onde associou-se a presença de bactérias com alto potencial de ocasionar a broncopneumonia e as manifestações encontradas, há um desacordo com os relatos de Benesi et al. (2013), pois com estes resultados pode-se afirmar, por exemplo, em casos de broncopneumonia por *Pasteurella multocida*, apenas uma manifestação pode já ser patognomônica do diagnóstico de broncopneumonia pois encontrou-se uma chance maior de 5,5; 7,3; 5,8; 9,6; 13 e 5 respectivamente de cada uma das manifestações citadas a frente serem indicativas de um quadro de broncopneumonia: tosse (0,035), secreção mucosa (0,068) e mucopurulento

(0,0215), submaciço (0,031), crepitação fina (0,058), e estertor úmido (0,003). Também Gonçalves et al. (2001) discorda da classificação de Benesi et al. (2013) pois relata em seu trabalho que a broncopneumonia é caracterizada pela alteração inflamatória de brônquios, bronquíolos e parênquima pulmonar e na inspeção a campo um forte indício de grande comprometimento nas trocas gasosas é o aumento da frequência respiratória, ou seja, este autor já relata que o aumento da frequência respiratória já é um grande indício da presença de animais com broncopneumonia. Este autor conclui que o corrimento nasal pode não ser uma alteração patognomônica desta enfermidade, pois ela pode ter origem brônquica ou pela inflamação da mucosa nasal. Logo, demonstra-se que há alterações mais específicas e outras que podem confundir o diagnóstico. Estudos como este são importantes, para que se possa saber as manifestações que realmente indicam esta enfermidade. Por exemplo, a presença de som maciço no gradil costal foi associado com a presença desta enfermidade. Já a tosse, com resposta positiva a estimulação de seu reflexo, pode também indicar o comprometimento da traquéia e não seria um bom indicador para casos de broncopneumonia.

A dispneia mista revela consolidação dos pulmões e a sua intensidade será fundamental na interferência das trocas gasosas. O mesmo pode ser dito em relação a presença de submacicez e macicez à percussão. O aumento dos sons respiratórios deve-se a melhor condução dos sons produzidos na respiração em uma maior quantidade de líquido intersticial provocado pela inflamação dos pulmões. Áreas de silêncio indicam comprometimento funcional do órgão pela obstrução física dos brônquios, bronquíolos e alvéolos. Os brônquios inflamados produzem líquido e dependendo de sua localização anatômica e quantidade presente produzirão diferentes sons à auscultação. A crepitação grossa indica presença de muito líquido nos brônquios de maior calibre, a crepitação fina demonstra líquido nos bronquíolos e brônquios de menor calibre que obstruídos causam interrupção da respiração. Pode também ocorrer a presença de frêmito torácico e traqueal de acordo com as quantidades de líquido presente (GONÇALVES et al., 2001).

Gonçalves et al. (2001) realizaram um trabalho onde, foram avaliados 48 bezerros sadios e doentes entre 1 e 6 meses de idade, com objetivo de determinar a diferenciação dos sinais clínicos da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. As presenças de frequência respiratória aumentada, dispnéia mista,

submaciez ou maciez, área de silêncio, crepitação grossa e os roncos e sibilos definiram o quadro como grave. Não se encontrou associação entre a presença de sororeagentes e a presença de alterações nos animais estudados, devido a fato já revelado anteriormente em que os animais poderiam não ter o quadro de pneumonia no momento da colheita do soro, houve colheita do lavado traqueal e o material até o momento não foi processado pois não era objetivo inicial do estudo. Gonçalves et al. (2001) ainda afirma que a pneumonia intersticial viral há tosse seca e áspera frequente que é característica. Não foi encontrado neste estudo associação entre os sororeagentes e estas alterações.

Sabe-se que o BRSV pode estabelecer de forma súbita pneumonia entre 50 a 80% dos bezerros leiteiros com sinais clínicos de uma pneumonia viral grave. Neste estudo a ocorrência deste vírus nos rebanhos estudados foi alta de 93,10%. Geralmente acomete animais entre 12 a 16 meses, sendo inicialmente notado pelo proprietário tosse, corrimento nasal moderado, perda do apetite, febre acima de 40°C durante 3 dias com posterior recuperação podendo persistir os sintomas em alguns dos animais. Neste estudo, notou-se que animais mais jovens apresentavam uma maior ocorrência de soro-reagentes. Não houve neste estudo associações entre a presença de soro-reagentes e as alterações clínicas acima citadas.

Na literatura comenta-se que as infecções de BoHV-1 apresentam sinais com grande variação de gravidade dependendo da cepa do vírus presente. Não houve isolamento neste estudo deste vírus, por isso não se pode discutir tal afirmação. Nos Estados Unidos, a doença geralmente se apresenta de forma mais branda nos rebanhos leiteiros e de corte tendo uma maior intensidade geralmente nos confinamentos pela grande aglomeração. No Brasil, acredita-se que devido as criações serem mais extensivas a prevalência deste vírus é mais baixa, causando mais casos de aborto do que rinotraqueítes que predisponham alterações respiratórias. Quando ocorre, sabe-se que é de curta duração e que a campo é pouco observada. A forma repentina, citada por Radostits, Blood e Gay (2002) que causa a anorexia, tosse, febre de até 42°C, hiperemia grave da mucosa nasal com presença visual de necrose nos septos nasais, corrimento seroso nasal e lacrimal bilateral, aumento da salivação não foi observado nos animais estudados.

O prejuízo econômico de milhões de bovinos acometidos por esta enfermidade na Europa pode chegar a 576 milhões de euros. Estima-se que o *M.*

bovis é responsável por um terço a um quarto de todas as perdas por doenças respiratórias (NICHOLAS; AYLING, 2003; NICHOLAS, 2004). Nos Estados Unidos, o USDA (2011) informou que perda total da indústria de confinamentos chega a mais de US\$ 1 bilhão anualmente (WELSH et al., 2004; RICE et al., 2007; SING et al., 2011; USDA, 2011). Estudos mais pontuais como o de Houe (2003) relatou em sua revisão que no Canadá surtos agudos de BVDV causou mortalidades média de 9% e perdas estimadas de US\$ 70 mil em média por rebanho leiteiro afetado.

No Brasil, apesar de uma alta incidência de doenças respiratórias nos rebanhos bovinos, ainda não existem dados sobre custos atribuídos a ocorrência destas enfermidades (GONÇALVES; FEITOSA, 2004). Devido aos achados dessa pesquisa e de outras citadas neste trabalho realizadas no Brasil, deve-se chamar a atenção para a importância do estudo da broncopneumonia, pois muitas vezes devido a falta de um diagnóstico definitivo esta enfermidade é colocada em um segundo plano, deixando uma falsa impressão sobre a realidade desta no Brasil. A falta de estudos da etiologia e da forma clínica em que esta doença ocorre no país é um argumento forte para que se inicie estudos e pesquisas nesta área. A dificuldade de colheita e de encontrar laboratórios especializados para o estudo de agentes virais e bacterianos, são um entrave para o conhecimento da sua frequência no país. Deve-se informar aos órgãos competentes para que se realize programas de controle que consiga auxiliar os médicos-veterinários a solucionarem este problema no campo.

6 CONCLUSÕES

1 - Há a presença de formas virais e bacterianas de broncopneumonia em 2 fazendas do Estado de São Paulo.

2 – A raça Holandesa se mostrou mais predisponente para a instalação de quadros de broncopneumonia do que animais sem raça definida (0,095, $p<0,1$)

3 - A *Pasteurella multocida* foi o agente de maior importância como causador de broncopneumonia (0,076, $p<0,1$) neste estudo, com a associação negativa a presença de alterações clínicas como secreção muco-purulenta (0,0215, $p<0,1$) e mucosa (0,068, $p<0,1$), som submaciço (0,031, $p<0,1$), crepitação fina (0,058, $p<0,1$) e estertor úmido (0,003, $p<0,1$) e com associação positiva no caso da tosse (0,035, $p<0,1$).

4 – Houve associação entre a maior presença de *Mollicutes* (0,025 $p<0,1$) em animais jovens

5 – Houve associação entre a ausência de *Mollicutes* e o som submaciço (0,025, $p<0,1$).

6 - *M. díspar* não foi causador de broncopneumonia em bovinos havendo associação negativa entre animais infectados e a presença de sibilo (0,076, $p<0,1$) e estertor úmido (0,046, $p<0,1$).

7 – Houve associação entre a presença de BVDV e a presença de broncopneumonia (0,080, $p<0,1$))

8 - Há uma nova classificação que pode ser fundamentada neste estudo para o diagnóstico da broncopneumonia através da associação de manifestações clínicas com agentes etiológicos causadores de tal enfermidade.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, I.; GATTI S. P.; MEDEIROS, A. S. R.; BUZINARO, M. G.; SAMARA, S. I. Atividade viral do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bezerros leiteiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 252-258, 2012.
- AL-GHAMDI, G. M.; AMES T. R.; BAKER, J. C.; WALKER, R.; CHASE, C. C. L.; FRANK, G. H.; MAHESWARAN, S. K. Serotyping of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica isolates from the upper Midwest United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 6, p. 576-578, 2000.
- ANGEN, O.; THOMSEN, J.; LARSEN, L. E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGARD, P. M. H.; ENEMARK, J. M. D. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1-2, p. 165-171, 2009.
- ARCANGIOLI, M. A.; DUET, A.; MEYER, G.; DERNBURG, A.; BEZILLE, P.; POUMARAT, F.; LE GRAND, D. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. **Veterinary Journal**, v. 177, p. 89-93, 2008.
- AYLING, R. D.; BASHIRUDDIN, S. E.; NICHOLAS, R. A. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. **Veterinary Record**, v. 155, n. 14, p. 413-416, 2004.
- BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. D.; 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**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, 2005.
- BENESI, F. J.; BERTAGNON, H. G.; WACHHOLZ, L.; LEAL, M. L. R.; FERNANDES, W. R.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Microbiota bacteriana e citologia da região traqueobrônquica de bezerros no período neonatal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 700-704, 2013.
- BERTAGNON, H. G.; SILVA, P. E. G.; WACHHOLZ, L.; LEAL, M. L. R.; FERNANDES, W. R.; BENESI, F. J. Imunoglobulinas no trato respiratório de bezerros saudáveis durante o primeiro mês de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 487-490, 2007.
- BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; DE SOUZA, V. E.; SANTOS, H. P.; DE MORAIS, P. 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.
- BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J. P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOF, P.

Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 3, p. 285-295, 2000.

BRASIL, N. D. A.; HINNAH, F. L.; FISS, L.; SALLIS, E. S.; GRECCO, F. B.; LADEIRA, S. R.; SCHILD, A. L. Doenças respiratórias em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 33 surtos¹. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 745-751, 2013.

BRODERSEN, B. W. Bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 323-333, 2010.

CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; HUBNER, S. O.; OLIVEIRA, M. T.; SILVA, A. D.; ESTEVES, P. A.; ROEHE, P. M.; RIJSEWUIJK, F. A. M. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1, p. 67-73, 2009.

CARDOSO, M. V.; SFORSIN, A. J.; SCARELLI, E.; TEIXEIRA, S. R.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; GENOVEZ, M. E. Importância do diagnóstico diferencial em um surto de pneumonia enzoótica bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 111-113, 2012.

CARDOSO, M. V.; TEIXEIRA, S. R.; MIYASHIRO, S.; VASCONCELOS, S. A.; GREGORY, L.; GENOVEZ, M. E. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 33-40, 2006.

CASTRUCCI, G.; MARTIN, W. B.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; SALVATORI, D.; TAGLIATI, S.; CUTERI, V. A serological survey of bovine herpesvirus-1 infection in selected dairy herds in northern and central Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 315-317, 1997.

CERQUEIRA, R. B.; CARMINATI, R.; SILVA, J. M.; SOARES, G. C.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 497-500, 2000.

COUTINHO, A. S.; OLIVEIRA FILHO, J. P. de; SILVA, D. P. G.; OLIVEIRA, A. P.; PAES, A.C.; AMORIM, R. M.; GONÇALVES, R. C. Mannheimiose pulmonar experimental em bezerros: swab nasal e retrofaríngeo como auxílio diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 83-88, 2009.

COWLEY, D. J.; CLEGG, T. A.; DOHERTY, M. L.; MORE, S. J. Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 40, 2011.

DA SILVA, D. P. G.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; COUTINHO, A. S.; DE OLIVEIRA, A. P.; ROCHA, N. S.; GONÇALVES, R. C. Biópsia pulmonar em bezerros com broncopneumonia induzida pela Mannheimia haemolytica. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 918-925, 2009.

DE SOUZA COUTINHO, A.; DE OLIVEIRA FILHO, J. P.; PESSOA, D.; DA SILVA, G.; DE OLIVEIRA, A. P.; MARCONDES, J. S.; CHIACCHIO, S. B.; PAES, A. C.; SIQUEIRA, A. K.; AMORIN, R. M.; GONÇALVES, R. C. Mannheimiose pulmonar experimental em bezerros: swab nasal e nasofaríngeo como auxílio diagnóstico¹. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 83-88, 2009.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; FERREIRA-NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; MULLER, E. E. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 39-47, 2013.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M. J. P.; MOOJEN, V.; ARNS, C. W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U. M. D. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 77-81, 1997.

DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, n. 12, p. 815, 1990.

EIRAS, C.; DIÉGUEZ, F. J.; SANJUÁN, M. L.; YUS, E.; ARNAIZ, I. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 in cattle in Galicia (NW Spain). **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 4, p. 800-806, 2009.

ELAZHARY, M. A.; ROY, R. S.; CHAMPLIN, R.; HIGGINS, R.; MARSOLAIS G. Bovine respiratory syncytial virus in Quebec: antibody prevalence and disease outbreak. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 44, n. 3, p. 299, 1980.

ELVANDER, M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Record**, v. 138, n. 5, p. 101-105, 1996.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of Mycoplasma gallisepticum. **Avian Diseases**, v. 39, n. 4, p. 729-735, 1995.

FULTON, R. W. Bovine respiratory disease research (1983-2009). **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 2, p. 131-139, 2009.

FULTON, R. W.; BLOOD, K. S.; PANCIERA, R. J.; PAYTON, M. E.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. T.; WELSH, R. D.; JOHNSON, B. J.;

RECK, A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 4, p. 464-477, 2009.

GHONEIM, H. A.; HASSAN, N. I.; ELHALAWANY, H. A.; NABIH, A. M. Mixed infections of bovine viral diarrhea virus, mycoplasma species and Mannheimia Haemolytica in calves showed chronic pneumonia with reference to the histopathological findings of the affected lungs. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 538-555, 2010.

GONÇALVES R. C. **Estudo da flora traqueobrônquica em bezerros clinicamente saudáveis e portadores de pneumonia, na região de Botucatu, SP**. 1987. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1987.

GONÇALVES, D. D. A.; SPILKI, F. R.; CHIMINAZZO, C.; OLIVEIRA, M. A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil: relato de caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 953-956, 2003.

GONÇALVES, R. C. Semiologia do sistema respiratório. In: FEITOSA, F. L. **Semiologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2004. p. 313-331.

GONÇALVES, R. C.; KUCHEMBUCK, M. R. G.; CURI, P. R.; CHIACCHIO, S. B.; ALMEIDA, C. T. D.; BORGES, A. S. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 263-269, 2001.

GONZALEZ-GARCIA, M. A.; ARENAS-CASAS, A.; CARBONERO-MARTÍNEZ, A.; BORGE-RODRÍGUEZ, C.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; MALDONADO, J. L.; GOMEZ-PACHECO, J. M.; PEREA-REMUJO, J. A. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus type 1 (BHV1) infection in non-vaccinated cattle herds in Andalusia (South of Spain). **Spanish Journal of Agricultural Research** v. 7, n. 3, p. 550-554, 2009.

GORDEN, P. J.; PLUMMER, P. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 243-259, 2010.

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M. M.; KUSZAK, J.; McVEY, D. S. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 381-394, 2010.

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

HAGGLUND, S.; SVENSSON, C.; EMANUELSON, U.; VALARCHER, J. F.;

ALENIUS, S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 2, p. 320-328, 2006.

HANAA, A. G.; NAGLAA, I. H.; HANAA, A. E.; NABIH, A. M. Mixed infection of bovine viral diarrhoea virus, Mycoplasma species and Mannheimia haemolytica in calves showed chronic pneumonia with reference to the histopathological findings of the affected lungs. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 538-555, 2010.

HARTEL, H.; NIKUNEN, S.; NEUVONEN, E.; TANSKANEN, R.; KIVELA, S. L.; AHO, P.; SOVERI, T.; SALONIEMI, H. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 45, n. 3-4, p. 193-200, 2004.

HOTCHKISS, E. J.; DAGLEISH, M. P.; WILLOUGHBY, K. Prevalence of Pasteurella multocida and other respiratory pathogens in the nasal tract of Scottish calves. **Veterinary Record**, v. 167, p. 555-560, 2010.

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

JARAMILLO-ARANGO, C. J.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CAMPUZANO-OCAMPO, V.; SUAREZ-GUEMES, F.; DELGADO-GONZALEZ, R.; TRIGO, F. Characterisation of Mannheimia sp. and P. multocida strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico. **Journal Animal Veterinary Advances**, v. 6, p. 1398-1404, 2007.

JARAMILLO-ARANGO, C. J.; HERNANDEZ-CASTRO, R.; SUAREZ-GUEMES, F.; MARTINEZ-MAYA, J.; AGUILAR-ROMERO, F.; JARAMILLO-MEZA, L.; TRIGO, F. J. Prevalence of Mannheimia haemolytica isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North–Central of Mexico. **Journal Animal Veterinary Advances**, v. 6, p. 404-409, 2007.

JONG, A.; THOMAS, V.; SIMJEE, S.; MOYAERT, H.; GARCH, F. E.; MAHER, K.; MORRISEY, I.; BUTTY, P.; KLEIN, U.; MARION, H.; RIGAUT, D.; VALLÉ, M. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 202-215, 2014.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2007.

KAMPA, J.; ALENIUS, S.; EMANUELSON, U.; CHANLUN, A.; AIUMLAMAI, S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: self clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 223-230, 2009.

KATSUDA, K.; KAMIYAMA, M.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; Tsunemitsu, H.; EGUCHI, M. Serotyping of Mannheimia haemolytica isolates from bovine pneumonia: 1987–2006. **Veterinary Journal**, v. 178, n. 1, p. 146-148, 2008.

KUDO, T.; SEIMIYA, Y. M.; SASAKI, K.; TAKAHASHI, M.; TAMURA, T.; SEKI, Y.; KONNO, M. An Epidemic of Necrotic Bronchopneumonia Caused by Mannheimia haemolytica Serotype 6 on a Dairy Farm. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 60, n. 5, p. 354-358, 2007.

KUNRATH, C. F.; VOGEL, F. S. F.; OLDONI, I.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DEZENGRINI, R.; TORRES, F. D.; PAN, K. A. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1877-1883, 2004.

KUSILUKA, L. J.; OJENIYI, B.; FRIIS, N. F. Increasing prevalence of Mycoplasma bovis in Danish cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 41, n. 2, p. 139-146, 2000.

LE, G. D.; CALAVAS, D.; BRANK, M.; CITTI, C.; ROSENGARTEN, R.; BÉZILLE, P.; POUMARAT, F. Serological prevalence of Mycoplasma bovis infection in suckling beef cattle in France. **Veterinary Record**, v. 150, n. 9, p. 268-273, 2002.

LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB 1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.

MAILLARD, R.; ASSIÉ, S.; DOUART, A. **Respiratory disease in adult cattle**. In: Proceedings of XXIV WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice, France. 2006. Disponível em: <<http://www. ivis. org/proceedings/wbc/wbc2006/maillard. pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

MARCONDES, J. S. **Estudo clínico-citológico em ovinos sadios e portadores de afecções pulmonares de ocorrência natural, utilizando-se o lavado traqueobrônquico como auxílio diagnóstico**. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007.

MAUNSELL, F. P.; DONOVAN, G. A. Mycoplasma bovis infections in young calves. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 25, n. 1, p. 139-177, 2009.

MAUNSELL, F. P.; WOOLUMS, A. R.; FRANCOZ, D.; ROSENBUSCH, R. F.; STEP, D. L.; WILSON, D. J.; JANZEN, E. D. Mycoplasma bovis infections in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 4, p. 772-783, 2011.

MOTTA, G.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P.; SOARES, T. C. S. Perfil de sensibilidade de amostras de Pasteurella multocida e Mannheimia haemolytica

isoladas na região de Botucatu, São Paulo, Brasil, no período de janeiro de 2000 a novembro de 2007. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 173-179, 2012.

MSOLLA, P. M.; WISEMAN, A.; SELMAN, I. E. The prevalence of serum neutralizing antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland. **Journal of Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 209-215, 1981.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999.

NICHOLAS, R. A. J. Recent developments in the diagnosis and control of mycoplasma infections in cattle. **Medecin Veterinaire du Quebec**, v. 34, p. 21-22, 2004.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2003.

NIKUNEN, S.; HARTEL, H.; ORRO, T.; NEUVONEN, E.; TANSKANEN, R.; KIVELA, S. L.; SANKARI, S.; AHO, P.; PYORALA, S.; SALONIEMI, H.; SOVERI, T. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 143-151, 2007.

NORSTRÖM, M.; PFEIFFER, D. U.; JARP, J. A space–time cluster investigation of an outbreak of acute respiratory disease in Norwegian cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 47, n. 1, p. 107-119, 2000.

NORSTRÖM, M.; SKJERVE, E.; JARP, J. Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, n. 1, p. 87-96, 2000.

PARDON, B.; DE BLEECKER, K.; DEWULF, J.; CALLENS, J.; BOYEN, F.; CATRY, B.; DEPREZ, P. Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. **Veterinary Record**, v. 169, n. 11, p. 278, 2011.

PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; 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, n. 15, p. 385-391, 1998.

PEIXOTO, P. V.; MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; DE SOUZA, M. I. Infecção natural pelo Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 171-175, 2000.

PORTIS, E.; LINDEMAN, C.; JOHANSEN, L.; STOLLMAN, G. A ten-year (2000–2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory

disease complex—*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni*—in the United States and Canada. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 5, p. 932-944, 2012.

PUNTEL, M.; FONDEVILA, N. A.; VIERA, J. B.; O'DONNELL, V. K.; MARCOVECCHIO, J. F.; CARRILLO, B. J.; SCHUDEL, A. A. Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v. 46, n. 3 p. 157-162, 1999.

QUINN P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RAAPERI, K. **Epidemiology, impact on herd health and control of bovine herpesvirus 1 in Estonian dairy cattle herds**. 2012. Tese (Doutorado) – Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonian University of Life Sciences, Tartu, Estônia, 2012.

RAAPERI, K.; ORRO, T.; VILTROP, A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, p. 249-256, 2014.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma**: molecular characterization. San Diego: Academic Press, 1995. v. 1, p. 33-41.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RICE, J. A.; CARRASCO-MEDINA, L.; HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 117-128, 2007.

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, n. 2, p. 359-364, 2007.

RIZZO, Huber. **Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade-SP**. 2006. 111 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 139-163.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, p. 396-403, 2004.

SANTOS, M. R.; FERREIRA, H. C. C.; SANTOS, M. A. D.; SARAIVA, G. L.; TAFURI, N. F.; SANTOS, G. M. D.; 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.

SHAHRIAR, F. M.; CLARK, E. G.; JANZEN, E.; WEST, K.; WOBESER, G. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 11, p. 863, 2002.

SHIRVANI, E.; LOTFI, M.; KAMALZADEH, M.; NOAMAN, V.; BAHRIARI, M.; MOROVATI, H.; HATAMI, A. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 1, p. 191-195, 2012.

SINGH, K.; RITCHEY, J. W.; CONFER, A. W. Mannheimia haemolytica Bacterial-Host Interactions in Bovine Pneumonia. **Veterinary Pathology Online**, v. 48, n. 2, p. 338-348, 2011.

SOLIS-CALDERON, J. J.; SEGURA-CORREA, J. C.; AGUILAR-ROMERO, F.; SEGURA-CORREA, V. M. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 82, n. 1, p. 102-110, 2007.

SOLIS-CALDERON, J. J.; SEGURA-CORREA, V. M.; SEGURA-CORREA, J. C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 3, p. 253-262, 2005.

SPRINGER, W. T.; FULTON, R.W.; HAGSTAD, H. V.; NICHOLSON, S. S.; GARTON, J. D. Prevalence of *Mycoplasma* and *Chlamydia* in the nasal flora of dairy calves. **Veterinary Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 351-357, 1982.

SRIKUMARAN, S.; KELLING, C. L.; AMBAGALA, A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 02, p. 215-229, 2007.

STÅHL, K.; RIVERA, H.; VAGSHOLM, I.; MORENO-LÓPEZ, J. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, n. 3, p. 193-202, 2002.

SUZAN, V. M.; ONUMA, M.; AGUILAR, R. E.; MURAKAMI, Y. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 3-4, p. 125-132, 1983.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: ciências agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2004.

TEKES, L.; MARKOS, B.; MÉHESFALVI, J.; MÁTÉ, Z.; KUDRON, E.; KECSKEMÉTI, S. Prevalence of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infection in Hungarian cattle herds. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 47, n. 3, p. 303-309, 1999.

TER LAAK, E. A.; WENTINK, G. H.; ZIMMER, G. M. Increased prevalence of *Mycoplasma bovis* in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 14, n. 3, p. 100-104, 1992.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (USA). **Treatment of respiratory disease in U.S. Feedlots**. Fort Collins, CO: USDA-APHIS-VS, CEAH, 2001.

VALARCHER, J. F.; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 153-180, 2007.

VAN WUIJCKHUISE, L.; BOSCH, J.; FRANKEN, P.; FRANKENA, K.; ELBERS, A. R. W. Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. **Veterinary Record**, v. 142, n. 8, p. 181-184, 1998.

VIANA, L.; GONÇALVES, R. C.; FILHO, J. P. O.; PAES, A. C.; CHIACCHIO, S. B.; RIBEIRO, M. G. Susceptibilidade in vitro a antimicrobianos da *Mannheimia haemolytica* e da *Pasteurella multocida* isoladas de ovinos sadios e com doenças respiratórias. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 111-114, 2007. Supplement.

VIANA, L.; GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; PAES, A. C.; AMORIM, R. M. Ocorrência de *Mannheimia haemolytica* e de *Pasteurella multocida* em ovinos sadios e com enfermidade respiratória. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1579-1582, 2007.

WELSH, R. D.; DYE, L. B.; PAYTON, M. E.; CONFER, A. W. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 426-431, 2004.

WHITE, B. J.; HANZLICEK, G.; SANDERSON, M. W.; ANDERSON, D. E.; LARSON, R. L. Mollicutes species and *Mycoplasma bovis* prevalence and association with

health outcomes in beef feeder calves at arrival and initial treatment for bovine respiratory disease. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 9, p. 1016, 2010.

WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. **Mycoplasmosis in animals**: laboratory diagnosis, AAVLD, Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1994. 173 p.

WOODBINE, K. A.; MEDLEY, G. F.; MOORE, S. J.; RAMIREZ-VILLAESCUSA, A. M.; MASON, S.; GREEN, L. E. A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 1, p. 5, 2009.

YATES, W. D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 3, p. 225, 1982.

YEARY, T.; NIETFIELD, J. C. **Prevalence of Mycoplasma bovis in bovine pneumonia and arthritis**. Cattlemen's Day. Kansas: Kansas State University, 2002. p. 145-147.

YEŞİLBAĞ, K.; GÜNGÖR, B. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. **Tropical Animal Health and Production**, v. 40, n. 1, p. 55-60, 2008.

ZAGHAWA, A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 45, n. 1-10, p. 345-351, 1998.

ZAHER, K. S.; SYAME, S. M.; ELHEWAIRY, H. M.; MARIE, H. S. Investigation of Bovine Respiratory Disease Complex in Egypt with Emphasis on Some Viral and Bacterial Pathogens. **Life Science Journal**, v. 11, n. 6, p. 56-62, 2014.