NATÁLIA CARRILLO GAETA

Avaliação da broncopneumonia de bezerros criados nos assentamentos de
Presidente Venceslau e Presidente Epitácio

São Paulo

2016

NATÁLIA CARRILLO GAETA

Prevalência de avaliação clínica da broncopneumonia de bezerros criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio de Mirante de Paranapanema

Dissertação/Tese 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/Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Lilian Gregory

De acordo:

Orientadora

São Paulo
2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.3339
FMVZ

Gaeta, Natália Carrillo
Avaliação da broncopneumonia de bezerros criados nos assentamentos de
Presidente Venceslau e Presidente Epitácio / Natália Carrillo Gaeta. -- 2016.
111 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Gregory.

1. Complexo de doenças respiratórias dos bovinos. 2. BoHV-1. 3. VDVB. 4. VRSB.
5. Micoplasma. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação Clínica da Broncopneumonia de bezerros nos assentamentos da região de Presidente Epitácio e Presidente Venceslau", protocolado sob o CEUA nº 7973040214, sob a responsabilidade de **Lilian Gregory e equipe; Natália Carrillo Gaeta; Rodrigo Carvalho Bicalho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/10/2014.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 164 Bovines (164 females), protocol number CEUA 7973040214, under the responsibility of **Lilian Gregory and team; Natália Carrillo Gaeta; Rodrigo Carvalho Bicalho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/15/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **Fev/201** a **Fev/201**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Procedência:

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **164**

Linhagem: **Variável**

Peso: **a**

Resumo: O objetivo desta pesquisa inicialmente é estabelecer a prevalência regional da broncopneumonia e os sinais clínicos associados aos agentes etiológicos estudando-se os plantéis de 164 bovinos de leite dos assentamentos da microrregião de Presidente Epitácio e Presidente Venceslau. Paralelamente, será feito um estudo metagenômico de amostras de lavado traqueal de bezerros, sendo conduzido na Veterinary College, Cornell University, EUA.

Local do experimento:

São Paulo, 06 de junho de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GAETA, Natália Carrillo

Título: Prevalência e avaliação clínica da broncopneumonia de bezerros criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante do Paranapanema

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: _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é inteiramente dedicado
à Deus e a minha família, pilares que
sustentam minha vida.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê. ” (Arthur Schopenhauer)

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim. ”
(Francisco Cândido Xavier)

“... Teu trabalho é a oficina em que podes forçar a tua própria luz. ”
(Francisco Cândido Xavier, pelo espírito Emmanuel)

“Os animais têm alma e valem pelos melhores amigos”
(Francisco Cândido Xavier)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, pela oportunidade de me tornar mestre, por ter me dado força, saúde e sabedoria para completar mais um ciclo da minha vida.

Aos meus amados pais Geraldo e Rosana e minha querida irmã Isabella, pelo amor, apoio, compreensão e carinho de todos os dias, e por sempre me ensinarem e, principalmente, por me darem o exemplo do que é trilhar o caminho do bem, do amor e da caridade.

Aos meus avós Roberval e Ignês e tios Renata e Ronaldo por todo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amor, amigo e companheiro Daniel, pelo carinho, apoio, compreensão e paciência, principalmente durante o tempo em que permanecemos longe um do outro. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos meus companheiros de estimação que ainda estão ao meu lado: Nina, Nino e Tudinha e àqueles que já se foram: Penélope, Bob e Susy, meu muito obrigada por todo amor incondicional e carinho. Vocês são a razão por eu ter escolhido esta profissão. Aos melhores amigos que um ser humano por ter, ofereço-lhes todo meu amor.

À minha querida orientadora Prof^a. Dra. Lilian Gregory, pela oportunidade de ser sua aluna há sete anos, pelos ensinamentos, pela confiança que sempre depositou em mim e, principalmente, por me abrir as portas do mundo, o meu muito obrigada.

Aos meus grandes amigos Mário e Bruno, pelas risadas, apoio, carinho e ajuda. Sem vocês, esse trabalho não seria concluído.

À aluna de graduação Tatiane Lusivo Rosa, pela ajuda durante o processamento laboratorial e por me permitir ter a primeira experiência como orientadora, função que desejo desempenhar em breve.

À minha segunda família: Regis, Izadora, Maysa, Aline, Camila, Guilherme, Verena, aos mestres Prof. Dr. Lucas Miranda Marques e Prof. Dr. Jorge Timenetsky e a nossa mãezona Celminha pelo carinho, apoio, amizade, por cuidarem de mim sempre que precisei e por todos os ensinamentos. Sou muito grata pela confiança e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa no Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Por ter sido acolhida e ter meu trabalho reconhecido por todos vocês, me sinto a pessoa mais sortuda que conheço.

À Dra. Alessandra Figueiredo de Castro Nassar pela oportunidade de desenvolver meu trabalho no Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico, pelo carinho, amizade e por todos os ensinamentos a mim dados. Meu amor pela bacteriologia nasceu em seu laboratório, após ser sua orientada durante meus estágios. Às demais meninas do laboratório, Rosangela (Rô), Bernadete (Bê), Cristina (Cris) e Renata (Rê), o meu super obrigada.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Durigon, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela confiança e pelos grandes ensinamentos. Ao técnico deste laboratório Luciano Matsumiya Thomazelli, pela grande ajuda no processamento laboratorial e pelos ensinamentos durante o período em que estivemos trabalhando juntos, o meu muito obrigada.

Às pesquisadoras do Laboratório de Víruses de Bovídeos do Instituto Biológico, em especial a Dra. Edwiges Maristela Pituco e a Dra. Cláudia Pestana Ribeiro, agradeço pela parceria de tantos anos e, por mais uma vez, permitir que meu trabalho fosse desenvolvido neste importante laboratório.

A todos os veterinários da Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo “José Gomes da Silva” (ITESP) em especial aos veterinários André Ribeiro Lemos,

Fabício Laguna, Maurício e Estela pela parceria construída neste período, pela imensa ajuda durante o momento das coletas e por ter permitido o acesso aos assentamentos, permitindo o desenvolvimento da ciência e nosso crescimento como profissional, o meu imenso muito obrigada.

Ao pesquisador da Apta pólo regional Alta Sorocabana, Dr. Eidi Yoshihara, pela grande ajuda durante as coletas, pela parceria com nosso grupo de pesquisa e, principalmente, por nos receber em sua casa em todos os períodos de coleta. Muito obrigada pela confiança e pela generosidade.

Ao Professor Valdecir Marvulle pelas orientações e ajuda durante a análise estatística.

Ao Professor Ricardo Augusto Dias pela grande ajuda na determinação da amostragem durante o início do desenvolvimento do trabalho.

À todos os colegas de pós-graduação pela amizade, risadas, companheirismo durante as disciplinas e as conversas nos corredores.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida (PROCESSO FAPESP 2014/03188-3).

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

GAETA, N. C. **Avaliação da broncopneumonia de bezerros criados nos assentamentos de Presidente Venceslau e Presidente Epitácio.** [Evaluation of bronchopneumonia of calves raised in settlements from Presidente Venceslau e Presidente Epitácio.]. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O complexo respiratório bovino é um dos principais problemas encontrados em bovinos tanto confinados quanto àqueles criados a pasto, levando a importantes perdas econômicas devido aos altos índices de morbidade e mortalidade. O objetivo geral deste trabalho foi determinar a prevalência de *M. bovis*, *M. díspar*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *P. multocida*, *M. haemolytica*, Parainfluenza Bovino tipo-3 (PIb-3) e Influenza vírus D e a prevalência de anticorpos contra Vírus da Diarreia Viral Bovina (VDVB), Herpesvírus tipo -1 (BoHV1) e o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (VRSB) em bezerros sadios e com broncopneumonia criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante de Paranapanema - SP. Além disso, objetivava-se avaliar a associação destes micro-organismos com a presença da broncopneumonia e dos sinais e sintomas apresentados pelos animais durante a avaliação física. Estudou-se 141 bezerros, machos e fêmeas de até um ano de idade, os quais, após exame físico, foram classificados em sadios e com pneumonia. Foram coletadas amostras de lavado traqueobrônquico e sangue total para obtenção do soro. As amostras foram utilizadas para isolamento e identificação de *M. bovis*, *M. díspar*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *P. multocida* e *M. haemolytica*, detecção molecular de Parainfluenza Bovino tipo-3 (PIb-3) e Influenza vírus D (IVD) e detecção de anticorpos contra Vírus da Diarreia Viral Bovina (VDVB), Herpesvírus tipo -1 (HVBo-1) e o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (VRSB). Não houve isolamento de *P. multocida* e *M. haemolytica*. Dentre as bactérias aeróbias isoladas, observou-se maior frequência de isolamento de *Bacillus* sp., *Staphylococcus intermedius* e bactérias Gram-negativas não fermentadoras. *M. díspar* foi a única espécie de micoplasma identificada com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Faz-se necessário a busca por outras espécies de micoplasmas que podem estar relacionadas aos casos de broncopneumonia em bovinos. Não houve detecção de Parainfluenza Bovino tipo 3 e Influenza vírus D nas amostras de lavado traqueobrônquico. Os três municípios estudados apresentaram anticorpos para os vírus estudados. Observou-se prevalência de BoHV-1, VDVB e VRSB de 31,7%,

24,6 e 38,8%, respectivamente. Não houve associação entre o status de saúde dos bezerros e os achados microbiológicos e sorológicos. Foi observada associação entre enterobactérias e a variável “desidratação leve” ($p=0,033$ / OR= 11,25, IC: 1,809-41,834. Observou-se associações entre *Mollicutes* e a variável “secreção nasal serosa” ($p=0,03$). Concluiu-se que a broncopneumonia é uma enfermidade multifatorial. Faz-se, necessário, portanto, a associação dos achados de exames físico, microbiológicos e características do ambiente e manejo.

Palavras-chave: Complexo de doenças respiratórias dos bovinos. BoHV-1. VDVB. VRSB. *Mycoplasma*.

ABSTRACT

GAETA, N. C. **Evaluation of bronchopneumonia of calves raised in settlements from Presidente Venceslau e Presidente Epitácio** [Prevalência e avaliação clínica da broncopneumonia de bezerros criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante do Paranapanema]. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bovine respiratory disease complex is one of the major problems observed in feedlot and grazing cattle, causing economic losses due to high morbidity and mortality rates. The aim of this study was to determine the prevalence of *M. bovis*, *M. díspar*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *P. multocida*, *M. haemolytica*, Bovine Parainfluenza type-3 (bPI-3) and Influenza vírus D (IVD) and the prevalence of antibodies against Bovine Viral Diarrhea Vírus (BVDV), Bovine Herpesvírus type -1 (BoHV1) and Bovine Respiratory Syncytial Vírus (VRSB) in healthy and pneumonic calves raised in settlements located in Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante de Paranapanema – São Paulo State. Moreover, we aimed to evaluate the association between those microorganisms and antibodies and the presence of bronchopneumonia and the symptoms observed during the physical examination. We studied 141 males and females calves that were classified as healthy and pneumonic calves. We collected tracheobronchial lavage samples and total blood to obtain serum samples. Isolation and biochemical/ molecular identification were performed in order to detect *M. bovis*, *M. díspar*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *P. multocida*, *M. haemolytica*, Bovine Parainfluenza type-3 and Influenzavírus D. Serological survey was performed to detect antibodies against Bovine Viral Diarrhea Vírus (BVDV), Bovine Herpesvírus type -1 (BoHV1) and Bovine Respiratory Syncytial Vírus (VRSB). There was not any isolation of *P. multocida* and *M. haemolytica*. *Bacillus* sp., *Staphylococcus intermedius* and Non-fermenter Gram-negative bacteria were higher prevalent compared to the other aerobic bacteria isolated. *M. díspar* was the only mycoplasma species identified by the primers used. It is necessary the identification of other mycoplasma species that could be related to the cases of bronchopneumonia in cattle. Bovine Parainfluenza type-3 and Influenza vírus D were not identified. Antibodies were detected in all municipalities. The prevalence of BoHV, BVDV e VRSB was 31.7%, 24.6 and 38.8%, respectively. The association

between health status and microbial/ serological findings was not observed. Enterobacterias were associated to “mild dehydration” ($p=0.033$ /OR=11.25; IC: 1.809-41.834). Associations between *Mollicutes* and “serous nasal discharge” ($p=0.03$) was also detected. In conclusion, *S. intermedius* was associated to “nasal air flow” ($p=0.097$). In conclusion bovine bronchopneumonia is multi-factorial disease. It is necessary, though, physical examination, microbiology and management and environment feature results.

Keywords: Bovine respiratory disease complex. boHV-1. BVDV. BRSV. Mycoplasma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação de filmes e manchas em crescimento de <i>Mycoplasma bovis</i> em ágar SP-4	36
Figura 2 - Eletromicrografia demonstrando VDVB com formato oval e pleomórfico	42
Figura 3 - Componentes estruturais da partícula viral dos herpesvirus. Comparação entre micro-eletrofotografia (à esquerda) e desenho esquemático (à direita)	45
Figura 4 - Morfologia do Vírus Respiratório Sincicial Bovino.....	47
Figura 5 - Caracterização da área de estudo	53
Figura 6 - Colônias de micoplasma isoladas de amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros.....	71
Gráfico 1 - Frequência de título de anticorpos anti-HVBo-1, anti-VDVB e anti-VRSB determinada pela reação de vírus-neutralização em soro de bezerros criados nos assentamentos dos município de Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo - 2016.....	75
Quadro 1 - Características presuntivas para determinação de <i>Pasteurella multocida</i> e <i>Mannheimia haemolytica</i>	59
Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da Classe Mollicutes, sequências e tamanho do produto amplificado	61
Quadro 3 - Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da espécie <i>M. bovis</i> , sequências e tamanho do produto amplificado	62

Quadro 4 - Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da espécie <i>M. dispar</i> , sequências e tamanho do produto amplificado	62
Quadro 5 - Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da espécie <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> SC, sequências e tamanho do produto amplificado	63
Quadro 6 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores sonda para detecção de Parainfluenza Bovino tipo -3 e Influenza vírus D.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de amostras coletadas e de propriedades visitadas nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016	56
Tabela 2 - Distribuição dos animais sadios e doentes estudados nos assentamentos das regiões de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016.....	69
Tabela 3 - Frequência de observação de bactérias aeróbias em amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros sadios e doentes criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo - 2016.....	70
Tabela 4 - Frequência de observação de colônias puras em amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros sadios e doentes criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo - 2016.....	71
Tabela 5 - Isolamento e identificação de bactérias da classe Mollicutes em colônias isoladas de amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo - 2016.....	72
Tabela 6 - Detecção de bactérias da classe Mollicutes e suas espécies por reação da cadeia da polimerase em amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016.....	72
Tabela 7 - Distribuição de animais reagentes e não reagentes ao teste de vírus-neutralização para VDVB, HVBo-1 e VRSB em amostras de soro de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de	

Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016.....	73
Tabela 8 - Prevalência de anticorpos contra VDVB, HVBo-1 e VRSB ao nível de rebanho após vírus-neutralização em amostras de soro de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016	73
Tabela 9 - Frequência simultânea de anticorpos contra os principais vírus relacionados às pneumonias bovinas, de acordo com o status de saúde de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016.....	74
Tabela 10 - Associação entre as bactérias aeróbias, Mollicutes e <i>M. dispar</i> e o status de saúde de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016.....	76
Tabela 11 - Associação entre VDVB, VRSB e HVBo-1 e o status de saúde de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016	76
Tabela 12 - Associação entre os dados do exame físico e os resultados microbiológicos e sorológicos de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016	77

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Celsius
µL	Microlitro
mL	Mililitro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
mg	Miligrama
µg	Microgramas
g	Gramas
mM	Milimolar
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
CO ₂	Gás Carbônico
BHI	Brain Heart Infusion
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
VDVB	Vírus da Diarreia Viral Bovina
HVBo-1	Herpesvírus Bovino tipo 1
VRSB	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
PIb-3	Parainfluenza bovino tipo 3
IVD	Influenzavírus D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	BRONCOPNEUMONIA E O COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO.....	24
2.1.1	Manifestações clínicas.....	24
2.1.2	Fatores de risco	25
2.1.3	Bactérias.....	26
2.1.3.1	Micoplasmas	27
2.1.3.1.1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC.....	30
2.1.3.1.2	Mycoplasma bovis	32
2.1.3.1.3	Mycoplasma díspar	36
2.1.3.2	<i>Pasteurella multocida</i>	37
2.1.3.3	<i>Mannheimia haemolytica</i>	40
2.1.4	Vírus	41
2.1.4.1	Vírus da diarreia viral bovina	42
2.1.4.2	Herpesvirus bovino tipo-1	44
2.1.4.3	Vírus respiratório sincicial bovino	47
2.1.4.4	Vírus Parainfluenza bovina tipo-3.....	49
2.1.4.5	Influenza vírus D.....	51
3	OBJETIVOS	53
3.1	OBJETIVO GERAL.....	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	AREA DE ESTUDO	55
4.2	AMOSTRAGEM.....	56
4.3	EXAME FÍSICO	57
4.4	AMOSTRAS	57
4.4.1	Soro	57
4.4.2	Lavado Traqueobrônquico	57
4.5	PROCESSAMENTO LABORATORIAL	58

4.5.1	Cultura e identificação de bactérias aeróbias	58
4.5.2	Detecção de micoplasmas.....	59
4.5.2.1	Cultivo e isolamento	59
4.5.2.3	Reação em Cadeia da Polimerase Convencional	61
4.5.2.3.1	PCR para determinação da classe Mollicutes	61
4.5.2.3.2	PCR específico para Mycoplasma bovis	61
4.5.2.3.3	PCR específico para Mycoplasma díspar.....	62
4.5.2.3.4	PCR específico para Micoplasma mycoides subsp. mycoides SC	63
4.5.2.4	Eletroforese em gel de agarose	64
4.5.2.5	Cepas de Referência.....	64
4.5.3	Detecção de anticorpos contra VDVB, HVBo-1 e VRSB	64
4.5.3.1	Vírus da diarreia viral bovina	64
4.5.3.2	Herpesvírus bovino tipo 1	65
4.5.3.3	Vírus respiratório sincicial bovino	66
4.5.3.4	Real-Time PCR para detecção de Parainfluenza bovina tipo- 3 e Influenza vírus D.....	67
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5	RESULTADOS.....	69
5.1	BACTÉRIAS AERÓBIAS	69
5.2	MICOPLASMAS	71
5.3	VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO PARA VDVB, HVBo-1 E VRSB	73
5.4	DETECÇÃO DE PARAINFLUENZA BOVINO TIPO-3 E INFLUENZA VÍRUS D POR RT-PCR	75
5.5	ESTATÍSTICA ANALÍTICA	75
5.5.1	Micro-organismos e pneumonia.....	75
5.5.2	Dados da ficha clínica X micro-organismos	77
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	89
	ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é composto por aproximadamente 212,3 milhões de cabeças (IBGE, 2014), sendo quase 39 milhões destas, responsáveis pela produção de leite no país (MAPA, 2014). No Brasil, estima-se que 91,5% dos produtores apresentem uma produção menor que 100 litros/dia, sendo estes, responsáveis por 47% da produção leiteira nacional (EMBRAPA, 2013), estando dentro desta contagem, as propriedades localizadas em muitos assentamentos brasileiros.

O complexo respiratório bovino (CRB) é um dos principais problemas encontrados em bovinos tanto confinados quanto aqueles criados a pasto, levando a importantes perdas econômicas devido aos altos índices de morbidade e mortalidade (USDA, 2013), principalmente nas pequenas propriedades, cujos investimentos na prevenção de enfermidades são muito baixos. Nos Estados Unidos, o CRB é a causa mais comum e onerosa de morte dos bovinos confinados (NAHMS, 2000a). Dados de 2011 mostraram que a média de custo do tratamento para um único caso de pneumonia em animais confinados nesta região era de US\$ 23,60, mais elevada quando comparado a custos com enfermidades neurológicas (US\$ 20,10), podais (US\$13,40) e digestivas (US\$9,90) (USDA, 2013). Estima-se que a indústria americana perca aproximadamente 500 milhões de dólares por ano em decorrência de custos com tratamento, mão de obra, mortes e diminuição na produção devido ao CRB (MILES, 2009). Embora não haja estudos detalhados sobre as consequências econômicas dessa condição para a produção bovina brasileira, estima-se que também seja elevado, dado a aquisição de medicamentos, serviço veterinário, diminuição da produção e mortalidade (LONERAGAN et al., 2001; SNOWDER, 2006).

Dentre os possíveis responsáveis pelos casos de pneumonia em bovinos, os vírus (Vírus da diarreia viral bovina, Herpesvírus bovino tipo 1, Parainfluenza bovina tipo-3 e Vírus respiratório sincicial bovino) e as bactérias (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e *M. díspar*) são os mais frequentemente reportados na literatura.

No Brasil, são poucos os estudos que abordam a patogênese da pneumonia de forma ampla (GONÇALVES et al., 1990; BENESI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2016¹ no prelo), sendo escassas as informações clínicas e epidemiológicas de animais criados em propriedades menos tecnificadas, que representam a maior parte do número de propriedades do Brasil. Desta maneira, mais estudos são necessários visando elucidar a realidade e a importância da etiologia desta enfermidade no rebanho dos assentamentos da região do estado de São Paulo e que preencham a lacuna existente sobre a enfermidade no país.

¹DE OLIVEIRA, B. A. F. D., GAETA, N. C., RIBEIRO, B. L. M. ALEMÁN, M. A. R. MARQUES, L. M., TIMENETSKY, J., MARQUES, J. A., MELVILLE, P. A.; MARVULLE, V.; GREGORY, L. Determination of bacterial etiologic factor on tracheobronchial lavage in relation to clinical signs of bovine respiratory disease. **Journal of Medical Microbiology**, 30 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000345.v1>>. no prelo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BRONCOPNEUMONIA E O COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO

A broncopneumonia foi definida por Radostits et al. (2002) como a alteração inflamatória do parênquima pulmonar, brônquios, bronquíolos e pleura. É parte componente do complexo respiratório bovino (CRB) e é considerada sério agravo na sanidade do rebanho. Além disso, é responsável por problemas de cunho econômico decorrentes de sua ocorrência e aos altos índices de morbidade e mortalidade (GONÇALVES, 2009; USDA, 2013). O CRB gera altos custos com tratamento, além de redução da produtividade e ganho de peso (HOLMAN et al., 2015). No rebanho bovino estado unidense, a mortalidade chegou a 1,6% em 2011 (HILTON, 2014), com custo anual de um bilhão de dólares (NG et al., 2015).

Considerado o problema mais frequente na criação de bezerros, é observado principalmente entre os mais jovens (HÄRTEL et al., 2004), especialmente entre duas e seis semanas de idade (VIRTALA et al., 1996) e parece não haver predileção por sexo (GONÇALVES et al., 2000). É uma condição multifatorial na qual estão inclusos agentes infecciosos como fatores determinantes e fatores predisponentes tais como estresse, condições ambientais e imunidade do hospedeiro (HÄRTEL et al., 2004).

2.1.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas estão relacionados ao tipo de patógeno envolvido, bem como ao grau de acometimento pulmonar e da capacidade respiratória. De modo geral, os animais podem apresentar perda de peso, síndrome febre e desidratação. Como sinais específicos que indicam alterações no aparelho respiratório, podemos destacar tosse e/ou resposta positiva ao reflexo de tosse, corrimento nasal sendo relacionado tanto à inflamação local, como à secreção de

origem brônquica e pulmonar (STÖBER, 1993), dispneia mista, sons maciços ou submaciços à percussão pulmonar, áreas aumentadas de ruído traqueobrônquico, além de presença de sons anormais à auscultação pulmonar, tais como crepitação fina (estertor seco), crepitação grossa (estertor úmido), ronco, sibilo, roce pleural, além de áreas de silêncio pulmonar, dependendo do grau de acometimento do pulmão. RADOSTITS, (2002) destaca que as pneumonias se manifestam clinicamente por aumento na frequência respiratória e alterações na amplitude, tosse, ocorrência de sons respiratórios anormais e, nos casos de pneumonias de origem bacteriana, pode-se observar septicemia.

2.1.2 Fatores de risco

No estudo da epidemiologia das doenças respiratórias, é importante destacar os principais fatores de risco associados à esta condição. São eles: ambiente, manejo e patógeno.

Temperatura, umidade e ventilação são importantes características do ambiente que aumentam o risco de desenvolvimento da condição. Um compilado de estudos feitos por Van der Fels-Klerx et al. (2002) mostrou que os bovinos eram mais predispostos ao CRB durante o inverno quando comparado ao verão, embora houvesse diferenças regionais. Gonçalves et al. (2000), entretanto, não observaram diferenças na prevalência do CRB entre as estações do ano.

O manejo dos bovinos é essencial para a prevenção e controle de muitas enfermidades, inclusive as respiratórias. O manejo errôneo é gerador de estresse e reduz a imunidade, tornando-os susceptíveis a infecções (HILTON, 2014). Práticas como desmame, transporte por longos períodos e agrupamento de animais de diferentes idades (HOLMAN et al., 2015), sexo e condições sanitárias são exemplos de manejo equivocado que predispõe à essas condições indesejadas (RADOSTITS, 2002; SANDERSON et al., 2008).

Embora os fatores descritos acima sejam importantes para predispor a pneumonia, as infecções pelos mais variados micro-organismos são determinantes

para o desenvolvimento desta condição. A dessemelhança entre a microbiota do sistema respiratório de animais sadios e doentes é determinado pelo desbalanço de três fatores: (1) imigração microbiana, relacionando possível inalação de micro-organismos, (2) eliminação dos micro-organismos, através do *clearance* mucociliar, tosse e imunidade do hospedeiro e, por fim, (3) condições regionais de crescimento microbiano, tais como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, competição entre micro-organismos locais e presença de células inflamatórias (DICKSON; HUFFNAGLE, 2015). Ressalta-se também que o desenvolvimento de problemas respiratórios é associado à maneira como os micro-organismos interagem entre si, seja de maneira positiva, como no sinergismo e no mutualismo, ou de maneira negativa, como na competição. A interação entre eles é determinante para o processo de colonização da mucosa respiratória, sendo influenciado por características do hospedeiro (imunidade, nutrição, bem-estar) e meio ambiente (ventilação, temperatura, higiene) (BOSCH et al., 2013a). Os processos de origem bacteriana e/ou viral são os mais frequentemente relatados, embora a pneumonia e broncopneumonia possam ter origem fúngica, parasitária e relacionada a agentes químicos e físicos (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

2.1.3 Bactérias

A literatura destaca com frequência a intensa participação de bactérias e vírus no desenvolvimento de problemas respiratórios. No grupo bacteriano, destacam-se *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Mycoplasma* sp (com especial importância do *M. bovis*) (HOLMAN et al., 2015). A broncopneumonia bacteriana pode, também, ser denominada febre dos transportes (TIMSIT et al., 2016).

2.1.3.1 Micoplasmas

Micoplasmas são bactérias pertencentes à Classe Mollicutes, Ordem *Mycoplasmatales* e Família *Mycoplasmataceae*, com aproximadamente 200 espécies oportunistas e parasitas de humanos, mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

O primeiro isolamento foi descrito por Nocard e Roux (1898) que estudavam a Pleuropneumonia Bovina. Descreveu-se um agente filtrável, semelhante a vírus, mas que cresciam em meios de cultura bacterianos. Microrganismos semelhantes isolados posteriormente foram denominados de PPLO – “Pleuropneumonia-Like Organisms” (RAZIN; JACOBS, 1992; MOROWITZ, 2002). São micro-organismos muito simples, com formato esférico e com diâmetro variando entre 0,3 µm -0,8 µm (RAZIN; HAYFLICK, 2010), compostos apenas por ribossomos, DNA circular dupla-fita e são envoltos por uma complexa membrana plasmática (RAZIN et al., 1998). Por muito tempo, foram considerados vírus dado a capacidade de transpor filtros que impediam a passagem de bactérias (RAZIN, 1992). São conhecidas por serem fastidiosas, ou seja, necessitam de muitos nutrientes para seu desenvolvimento e multiplicação, sendo essa característica associada ao genoma de pequeno tamanho (entre 0.58 a 2.2 megabases), com alta porcentagem de A+T (67% a 76%) (YOU; ZENG; WU, 2006). Sugere-se que o Gênero *Mycoplasma* surgiu por evolução de um ramo da linhagem de *Clostridium* (bactéria Gram-positiva), dado, provavelmente, pelo baixo conteúdo G+C e por possuir enzimas semelhantes a dos estreptococos e bactérias ácido-láticas (ROGERS et al., 1985).

Para o crescimento *in vitro* nutrientes como aminoácidos, nucleotídeos e esteróis exógenos são necessários, sendo este último presente no soro ou em células do hospedeiro, incorporado pela membrana da maioria das espécies, contribuindo na fluidez necessária à membrana e na resistência parcial à lise osmótica (RUHNKE; ROSENDAL, 1994). Devido ao pequeno tamanho do DNA, possuem baixa capacidade de biossíntese e, por isso, requerem estreita relação com as células hospedeiras para obter fatores nutricionais e de crescimento. São organismos resistentes à penicilina, posto que apresentam ausência de parede

celular (MAUNSELL; DONOVAN, 2009), implicando diretamente no tratamento dos animais.

O diagnóstico dos micoplasmas é realizado, atualmente, a partir da associação entre as técnicas diagnósticas como isolamento bacteriano, identificação bioquímica, sorológica e molecular. Por necessitarem de muitos nutrientes, são consideradas de difícil cultivo, sendo essencial a utilização de meios de cultura acrescidos de peptona, extrato de levedura, soro fetal equino, entre outros suplementos. Os principais meios de cultura utilizados são Hayflick e o SP-4 (RAZIN; HAYFLICK, 2010), embora existam outros meios mais seletivos para o crescimento de determinadas espécies, como o meio Frey (para crescimento de micoplasmas de aves) e o meio Friis (para micoplasmas suínos). A técnica de cultivo destas bactérias é considerada de baixa sensibilidade, já que pode ser influenciada pela presença de bactérias contaminantes (SCHNEE et al., 2011), que produzem excessivo volume de ácidos e álcalis, pelo método de coleta e armazenamento e pela falta de experiência do laboratorista.

O gênero *Mycoplasma* apresenta espécies fermentadoras e não fermentadoras. As primeiras são capazes de produzir ácidos a partir da fermentação da glicose e outros carboidratos, levando a diminuição do pH. Os não-fermentadores, por sua vez, utilizam a via arginina-deidrolase para obter ATP, ocorrendo a alcalinização do meio (RAZIN, 2010). Essas características são evidenciadas pela mudança de coloração dos meios sólido e líquido, dada presença de indicador de pH como o Vermelho de Fenol. Durante o crescimento em meio sólido, o centro das colônias fica geralmente abaixo da superfície do ágar (BROOKS et al., 2014), apresentando, ao microscópio estereoscópio, o aspecto característico de “ovo frito”, com aproximadamente 0,3 µm de diâmetro e 98 µm de extensão. Em meio líquido, o crescimento dos micoplasmas geralmente não gera turvação, havendo somente a alteração de pH, com consequente alteração na coloração do meio, dada presença de indicador de pH (RAZIN, 1998)

Os micoplasmas apresentam antígenos de superfície celular heterogêneos de maneira variável, sendo capazes de gerar variações antigênicas, caracterizando um importante mecanismo de evasão imunológica (NICOLSON et al., 1998). Algumas espécies como *M. gallisepticum*, *M. penetrans* e *M. genitalium*, invadem as

células não fagocíticas, permitindo sua persistência em hospedeiros imunocompetentes, acesso a importantes nutrientes para sua manutenção e evasão imunológica (ROTTEM, 2002). Podem, ainda, induzir a apoptose, como demonstrado nos estudos conduzidos por Paddenberg et al. (1996), no qual células infectadas por *M. hyorhinis* apresentaram fragmentação do DNA. Os danos celulares podem, também, ocorrer pela ação de espécies reativas de oxigênio produzidas e liberados pelos micoplasmas (RAZIN, 1998). Estas bactérias interagem com o sistema imune do hospedeiro provocando sua supressão ou estimulação. A supressão pode acontecer devido a depleção de arginina (utilizada no metabolismo dos micoplasmas), citotoxicidade em relação às células linfóides, produção de determinadas citocinas como IL-10, a qual inibe a atividade das células apresentadoras de antígeno e produção de IL-1b, TNF-a e IL-12 pelas células mononucleares. Já a ativação ocorre através da estimulação de células Natural Killer, monócitos e polimorfonucleares, além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (RAZIN, 1998).

O alto grau de especificidade e aderência às células hospedeiras são mecanismos de patogenicidade dos micoplasmas. A ausência de parede celular permite o íntimo contato com as células. Têm preferência pelas células mensequimatosas das membranas urogenital, gastrointestinal, olhos, glândula mamária e respiratória (HOWARD, 1984; RAZIN et al., 1998), sendo, desta forma, responsáveis por importantes enfermidades como a pneumonia. Algumas espécies como *M. pneumoniae* retardam o *clearence* traqueobronquial por longos períodos, sendo um importante fator predisponente para infecções por outras bactérias (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

São três as espécies de micoplasmas consideradas de maior importância na etiologia das pneumonias em bovinos: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma díspar*.

2.1.3.1.1 *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

M. mycoides subsp. *mycoides* SC (MmmSC) é considerado a espécie mais importante relacionada aos problemas respiratórios dos bovinos. É o agente etiológico da pleuropneumonia contagiosa bovina (CBPP), enfermidade pertencente a lista A da Organização Internacional de Epizootias (OIE) (antiga classificação das enfermidades de notificação obrigatória). É uma doença constantemente monitorada e de notificação obrigatória. Onze federações integram o grupo de países livres de CBPP da OIE: Argentina, Austrália, Botswana, Canadá, China, França, Índia, Portugal, Singapura, Suíça e Estados Unidos (OIE, 2014a).

O MmmSC é uma das espécies de micoplasmas pertencentes ao “mycoides cluster”, grupo composto por espécies patógenas de ruminantes com propriedades bioquímicas e sorológicas comuns entre si (BASCUÑANA et al., 1994; COUTINHO et al., 2009; MANSO-SILVÁN et al., 2009) *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri* (antigamente denominado *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma leachii* e *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* são as espécies que compõe o grupo (FISCHER et al., 2012), e que causam reações cruzadas aos diagnósticos convencionais (OIE, 2014).

Apesar da alta morbidade e mortalidade na população bovina, a CBPP não é uma zoonose. Nos bovinos, pode ser encontrada na forma aguda ou crônica, sendo que nesta última, os animais infectados são difíceis de identificar, dado que os sinais clínicos são mais brandos (OIE, 2014). Desta maneira, os animais acometidos por essa forma podem se tornar potenciais reservatórios da bactéria (WESTBERG et al., 2004; SCHNEE et al., 2011). Na forma aguda, os animais apresentam sinais inespecíficos, tais como anorexia, febre e sinais referentes ao acometimento do sistema respiratório: dispneia, polipneia, tosse e descarga nasal. Essas manifestações clínicas permitem que o clínico confunda a CBPP com outras enfermidades que acometem o sistema respiratório, tais como a pasteurelose. Ao exame *post-mortem*, os animais com infecção crônica apresentam lesões que sugerem a infecção pelo MmmSC e que para alguns pesquisadores são consideradas patognomônicas, sendo elas geralmente unilaterais e localizadas nos

pulmões e pleura. Observam-se focos de necrose e parênquima liquefeito, com tamanho e localização variáveis. Pode ser observada congestão de membrana dos brônquios, bem como obstrução do lúmen brônquico devido a presença de falsas membranas e fibrina (PROVOST A., PERREAU P., BRÉARD A., LE GOFF C., MARTEL J.L., 1987). Ao obter o completo sequenciamento do genoma do MmmSC, Westberg et al. (2004) verificaram diversos genes de potenciais fatores de virulência, como proteínas de superfícies variáveis (*vsp*), enzimas e proteínas de transporte responsáveis pela produção de peróxido de hidrogênio e cápsula, possíveis responsáveis por efeitos tóxicos no animal. Na forma aguda, as células mononucleares apresentam baixa capacidade de produção de interferon, sendo isso associado ao rápido desenvolvimento dos sinais.

São poucos os trabalhos que descrevem a prevalência do MmSC por todo o mundo. O continente africano é importante para a epidemiologia da doença já que apresenta caráter enzoótico. Na Etiópia, Alemayehy, Leta e Haily (2015) observaram soro-prevalência de 62,5%. Séry et al. (2014) verificaram prevalência individual de 18,11 % e em nível de rebanho de 85,93 % em Mali. No Quênia, a soro-prevalência foi de 16,4%, quando do uso combinado de cELISA e Teste de Fixação de Complemento (MATUA-ALUMIRA, R. W., NG'ANG'A, Z., KIARA, H., MATERE, C., MBITHI et al., 2006). Ao estudar abatedouros do norte da Tanzânia, Swai et al. (2013) observaram que 0,91% dos animais abatidos apresentavam lesões sugestivas de CBPP. Outros países como Itália, Turquia já detectaram o MmmSC nos animais (BASHIRUDDIN et al., 1999; CETINKAYA et al., 2003). No Brasil, não existem trabalhos que tenham conseguido isolar de bovinos ou encontrar bovinos soro-reagentes para esta espécie, embora esta bactéria tenha sido isolada do conduto auditivo de caprinos saudáveis (PEREIRA et al., 2003).

O diagnóstico de MmmSC pode ser realizado a partir do isolamento em meio líquido e sólido, além de provas bioquímicas, identificação molecular e sorologia. Em meio sólido, além da morfologia típica das colônias, MmmSC não forma “filmes e manchas” durante crescimento em SP-4 (OIE, 2014b). É sensível a digitonina (assim como todas as espécies da ordem *Mycopasmatales*), fermenta glicose (tornando o meio amarelo), reduz sal de tetrazólio, não hidrolisa arginina, não possui atividade de fosfatase e propriedades proteolíticas. A identificação sorológica pode ser realizada por teste de inibição do crescimento (DGIT), Teste de anticorpos

fluorescentes (FAT), imunofluorescência (IFA) e imunodifusão em gel de agarose (AGID) (OIE, 2014b). A identificação molecular pode ser realizada por meio da PCR convencional e PCR em tempo real, com protocolos padronizados e largamente utilizados pelos laboratórios especializados.

2.1.3.1.2 *Mycoplasma bovis*

M. bovis é considerada parte da microbiota normal do sistema respiratório dos bovinos (TER LAAK, E. A., NOORDERGRAAF, J. H. & BOOMSLUITTER, 1992). Por ser um micro-organismo oportunista, pode causar infecções em condições favoráveis, sendo, desta maneira, considerada a segunda espécie mais importante para as doenças respiratórias, acometendo principalmente os bezerros jovens (GABINAITIENE, A., SIUGZDAITE J., ZILINSKAS H., SIUGZDA R., 2011). Embora a pneumonia bacteriana seja considerada secundária (por se instalar após a infecção viral), estudos demonstram que a inoculação de *M. bovis* em bezerros causa pneumonia primária (GOURLAY; THOMAS; HOWARD, 1976; THOMAS; HOWARD; STOTT, 1986; POUMARAT et al., 2001). A literatura afirma que definir a participação desta espécie como agente primário ou secundário na patogenia das doenças respiratórias é um desafio (FULTON, 2009). O mesmo autor ainda afirma que a recuperação de *M. bovis* no final do estágio crônico da pneumonia indica a participação secundária desta bactéria.

São poucos os trabalhos que descrevem o impacto econômico gerado pela infecção por *M. bovis*. Caswell e Archambault (2008) referem que não é possível estimar as perdas econômicas de forma acurada já que a real contribuição desta espécie para o aparecimento pneumonia aguda é desconhecida. Trabalhos na Europa sugerem perda de 144 milhões de euros por ano (NICHOLAS; AYLING, 2003). Gevaert (2006) estimou perda de 58 euros por bezerro de corte, e 25 euros por bezerro leiteiro. Nos Estados Unidos, Rosengarten et al. (2000) estimaram perda de 32 milhões de dólares por ano devido a infecção respiratória por *M. bovis*. No Brasil, não existem trabalhos que avaliaram as perdas econômicas relacionadas a esta espécie.

Atualmente, sabe-se que esta espécie é um importante agente etiológico de mastite, artrite, problemas reprodutivos, septicemia e pneumonia (NICHOLAS; AYLING, 2003) e, portanto, merece especial atenção na produção de bovinos. A literatura destaca que *M. bovis* é mais bem adaptado ao trato respiratório anterior, onde permanece por longos períodos sem haver o desenvolvimento da doença (PFÜTZNER; SACHSE, 1996). Entretanto, seria disseminado para outros tecidos após a resposta inflamatória (MAUNSELL; DONOVAN, 2009), causada, por exemplo, por situações de estresse.

Esta espécie é conhecida pela capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro sendo esta característica relacionada a capacidade de variação antigênica, ou seja, de diversificar a expressão de proteínas de superfícies variáveis (*vsp*), importantes fatores de virulência relacionadas a aderência ou evasão do sistema imune do hospedeiro (LYSNYANSKY; RON; YOGEV, 20001). A determinação de quais *vsps* serão expressas em cada cepa bacteriana é realizada por um complexo sistema genético. Essa expressão diferenciada em cada cepa bacteriana permite que a bactéria se adapte a diferentes condições do hospedeiro, podendo aderir em diferentes tipos celulares (LYSNYANSKY; RON; YOGEV, 2001).

Animais acometidos por pneumonia decorrente da infecção por *M. bovis* apresentam sintomas inespecíficos, tais como baixo ganho de peso, perda do apetite e depressão, febre, dispneia, descarga nasal alterada e tosse (NICHOLAS; AYLING, 2003). Apesar da possibilidade de ocorrer pneumonia tendo o *M. bovis* como causa primária, a existência desta espécie de micoplasma é mais comumente associada a presença de *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* (STIPKOVITS; GLÁVITS; RIPLEY, 2000; HÄRTEL et al., 2004; GABINAITIENE et al., 2011), as quais levam a complicação do quadro respiratório (THOMAS et al., 2002). Vale ressaltar ainda que as pneumonias bacterianas, de modo geral, têm caráter secundário, ocorrendo após a infecção viral, mais frequentemente pelo vírus da diarreia viral bovina (SHAHRIAR et al., 2002). A associação entre *M. bovis* e *P. multocida* pode estar relacionada ao enfraquecimento do sistema imune do hospedeiro, dado o efeito das adesinas do micoplasma que levam a oxidação, quimioluminescência e degranulação de neutrófilos e linfócitos (FINCH J.M., 1990), favorecendo a colonização do trato respiratório por outras espécies.

Os animais infectados eliminam o *M. bovis* tanto via trato respiratório quanto pelo leite. Esta eliminação pode ocorrer por meses ou até anos e, pode, muitas vezes, ocorrer em animais aparentemente saudáveis. Desta forma, os animais tornam-se importantes fontes de infecção, e, podem ser os responsáveis pela introdução das bactérias em rebanhos livres (NICHOLAS; AYLING, 2003). A eliminação desta espécie acontece de forma intermitente, dificultando a identificação da fonte de infecção (WILSON, J.H., LOFSTEDT, 1990).

A transmissão do *M. bovis* pode ocorrer através do contato com secreção respiratória, aerossóis, contato nariz-nariz, além de vias indiretas, como alimentação, fômites e até por inalação (MAUNSELL; DONOVAN, 2009). Estudos prévios foram capazes de isolar do ar de ambiente infectado pela espécie (JASPER D.E., ALAUBAID J.M., 1974). É interessante destacar que a ingestão de leite infectado com *M. bovis* é importante para epidemiologia da doença. Bennett e Jasper (1977) verificaram que bezerros alimentados com leite infectado apresentaram as mais altas taxas de colonização nasal por *M. bovis* do que aqueles que não receberam esse leite.

Micoplasmas são susceptíveis a dissecação e a luz. Entretanto, *M. bovis* é capaz de sobreviver por longos períodos em ambiente protegido com adequada umidade e temperatura. Justice-Allen et al. (2010) verificaram que *M. bovis* é capaz de sobreviver em areia reciclada utilizada na cama das vacas. Se a reciclagem for realizada de forma errônea, a areia permanece com alta concentração de matéria orgânica e é possível a formação de biofilmes.

A resposta imune gerada pela infecção por *M. bovis* não é totalmente conhecida. Vanden Bush e Rosenbusch (2003) referem que esta espécie gera tanto a reação imune quanto a imunossupressão. (JUNGI et al., 1996) verificaram que após incubação com *M. bovis*, os macrófagos alveolares foram ativados, havendo produção de TNF- α e óxido nítrico. Vanden Bush e Rosenbusch (2003) ao caracterizarem a resposta imune pulmonar, observaram a ativação de todos os subconjuntos de linfócitos, bem como a resposta imune caracterizada por uma resposta tipo Th2. Howard, Thomas e Parsons (1987) verificaram que *M. bovis* invade o parênquima pulmonar a partir das vias aéreas, não tem efeito deletério na

atividade ciliar e provoca acúmulo de linfócitos T e B no pulmão, o qual se torna um sítio produtor de anticorpos.

Mycoplasma bovis é a segunda mais importante espécie de micoplasma, com importantes prevalências nos rebanhos ao redor do mundo. Estudando 25 rebanhos da Holanda, Ter Laak, Noordergraaf e Dijkstra (1992), observaram prevalência de 20%. Siugzdaite (2002), de maneira semelhante, verificou prevalência de 24,4% desta espécie em amostras de swab nasal. Thomas et al. (2002) observou 31,5% de prevalência ao estudar 388 animais. Castillo-Alcala et al. (2012) ao estudarem bovinos no momento da chegada à propriedade, aos 15 dias e aos 55 dias pós-chegada, observaram prevalência de 1,7%, 72% e 86% respectivamente. No Brasil, a primeira identificação de *M. bovis* ocorreu em 1978, a partir de bezerros com pneumonia criados no Estado de São Paulo (ROSSINI, 1978). Avaliando animais nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia, Marques et al. (2007) observaram prevalência de 12,2% somente em animais doentes.

O diagnóstico desta espécie pode ser realizado a partir do isolamento em meio líquido e sólido, provas bioquímicas, identificação molecular e sorologia. Em meio sólido, além da morfologia típica das colônias, *M. bovis* é conhecido pela formação de filmes e manchas (figura 1), devida provavelmente ao uso de fosfatidil etanolamina como substrato no meio sólido (THORNS, 1978). Não há fermentação de glicose, hidrólise de arginina e produção de urease (NICHOLAS; AYLING, 2003). A identificação molecular pode ser realizada por meio da PCR convencional e Real-Time PCR, com protocolos padronizados e largamente utilizados pelos laboratórios especializados. A identificação sorológica é realizada pela técnica de ELISA e sua importância está no fato de o nível de anticorpos se manterem altos por vários meses (NICHOLAS; AYLING, 2003), sendo útil nos quadros crônicos (NICHOLAS, 1997).

Figura 1 - Formação de filmes e manchas em crescimento de *Mycoplasma bovis* em ágar SP-4

Fonte: (GAETA, N. C., 2016)

2.1.3.1.3 *Mycoplasma díspar*

O primeiro isolamento em pulmões de bezerros doentes foi realizado por (GOURLAY; LEACH, 1970). Atualmente, sabe-se que esta espécie, assim como *M. bovis*, pode ser isolada do trato respiratório tanto de animais doentes quanto de saudáveis (TER LAAK, E. A., NOORDERGRAAF, J. H. & BOOMSLUITER, 1992). Diversos estudos mostram que esta espécie é encontrada em 50% dos rebanhos (ŠIUGŽDAITĖ; GABINAITIENĖ; ŠIUGŽDA, 2015).

Miles et al. (2004) destacaram que apesar de *M. díspar* ter sua distribuição completamente conhecida, sua importância para o complexo respiratório bovino não é completamente definida. As infecções respiratórias por *M. díspar* não são consideradas severas, sendo caracterizadas, muitas vezes, por infecções inaparentes. Howard, Thomas e Parsons, (1987) verificaram que *M. díspar* infecta as células epiteliais ciliadas, produz resposta imune celular mediana e pode apresentar propriedades imunossupressivas. Em cultivo de células traqueais fetais bovinas, os mesmos autores observaram ciliostase - processo de paralisação dos movimentos ciliares.

M. díspar é uma espécie distribuída mundialmente. Alguns trabalhos destacam a prevalência dessa espécie nos rebanhos bovinos. Šiugždaitė,

Gabinaitienė e Šiugžda (2015) estudando o trato respiratório superior de bovinos, observaram prevalência de 17,9% em animais sadios e de 83,3% naqueles com problemas respiratórios. Thomas et al. (2002) isolaram esta espécie em 45,5% do trato respiratório inferior de animais doentes, muitas vezes em co-infecção com *M. bovis*. Marques et al. (2007) detectaram *M. díspar* em 6,16% dos animais sadios e 34,84% dos animais doentes.

O diagnóstico é realizado da mesma maneira que as espécies anteriormente descritas. O isolamento requer meios suplementados e longos períodos de cultivo, já que é uma espécie considerada altamente fastidiosa (ŠIUGŽDAITĖ; GABINAITIENĖ; ŠIUGŽDA, 2015). Assim como as demais, apresentam formato de “ovo-frito”, embora a literatura destaque que nos primeiros momentos do cultivo, as colônias não apresentam a morfologia típica (MILES et al., 2004).

2.1.3.2 *Pasteurella multocida*

Pasteurella multocida é uma bactéria cocobacilo Gram-negativa, de aproximadamente 0,2 µm x 1 a 2 µm, pertencente ao gênero *Pasteurella*, o qual, juntamente com os Gêneros *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, e *Lonepinella*, formam a Família *Pasteurellaceae* (QUINN et al., 2005). Foi isolada pela primeira vez por Louis Pasteur em 1880, como agente causador de cólera aviária (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006). Semeada em ágar sangue de carneiro não apresenta hemólise. O Gênero *Pasteurella* apresenta espécies consideradas de menor e maior importância para a medicina veterinária. No primeiro grupo encontram-se 15 espécies: *P. aerogenes*, *P. anatis*, *P. avium*, *P. langaaensis*, *P. volantium*, *P. caballi*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. gallinarum*, *P. granilomatis*, *P. lymphangitidis*, *P. mairii*, *P. pneumotropica*, *P. stomatitis* e *P. testudinis*. No grupo de espécies de maior importância encontram-se a *P. multocida* e *P. trehalose* (QUINN et al., 2005).

A *P. multocida* é subdividida em quatro subespécies: *tigris*, *septica*, *gallicida* e *multocida*, sendo esta última a mais importante para o CRB. De acordo com a estrutura capsular e a composição de lipopolissacarídeos, é classificada em cinco

sorogrupos e dezesseis sorotipos, respectivamente. Dos sorogrupos existentes (A, B, D, E e F), o sorogrupo F foi isolado de frangos e perus, os sorogrupos B e E, isolados de bovinos e búfalos com septicemia hemorrágica e os sorogrupos A e D, isolados em casos de cólera aviária e de rinite atrófica e pneumonia suína. O sorogrupo A é considerado um dos principais agentes etiológicos das doenças respiratórias dos bovinos, sendo o A:3 o mais frequentemente atribuído a essas condições. Dentre as cepas de *P. multocida*, podem ser encontradas cepas patogênicas e comensais, as quais se diferenciam pela capacidade de induzir resposta inflamatória. As cepas patogênicas são capazes de ativar o sistema imune através do Toll-Like Receptor (TLR), importante mecanismo de ativação do sistema imune inato (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

A infecção por esta espécie ativa o sistema imune fagocitário, bem como as proteínas do sistema complemento. Entretanto, *Pasteurella multocida* apresenta mecanismos de evasão que garantem o sucesso da infecção. A cápsula é considerada uma das mais importantes, já que confere resistência a fagocitose e impede a atividade do sistema complemento (HARMAN et al., 1991). Cepas acapsuladas são consideradas menos virulentas quando comparadas as capsuladas (TSUJI; MATSUMOTO, 1989). Boyce e Adler (2000) observaram que cepas mutantes acapsuladas do sorotipo B apresentaram alta sensibilidade a fagocitose por macrófagos murinos. Além da cápsula, os lipopolissacarídeos (LPS) são importantes fatores de virulência para esta espécie. *P. multocida* necessita de uma completa estrutura de LPS para sua replicação e para o desenvolvimento da doença (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006). Além disso, são consideradas importantes pela sua capacidade de estimular imunidade humoral e por se apresentar como um antígeno protetor contra futuras infecções (WIJEWARDANA et al., 1990). Embora algumas bactérias sejam reconhecidas pela produção e liberação de potentes toxinas, as cepas da *P. multocida* envolvidas em septicemia hemorrágica, cólera aviária e pneumonia não possuem esse fator de virulência. A produção de toxina ocorre somente no sorotipo D, responsável pelo desenvolvimento de rinite atrófica em suínos (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006).

P. multocida é agente etiológico de enfermidades que geram consideráveis perdas econômicas, tais como septicemia hemorrágica bovina, cólera aviária, rinite atrófica suína e pneumonia enzoótica (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006). É

reconhecido como importante agente etiológico do complexo respiratório bovino (DABO; TAYLOR; CONFER, 2007), embora seja, também, isolada em animais sem a condição (THOMSON, 1981; AUTIO et al., 2007). A alta recuperação desta bactéria em animais sadios (GRIFFIN, 2010) sugere que esta espécie seja comensal nas membranas mucosas do trato respiratório superior e inferior. Por este motivo, as infecções por *P. multocida* ocorrem, em grande parte das vezes, por associação entre fatores predisponentes tais como questões climáticas, problemas nutricionais e a interação com outras bactérias, sendo que em relação a esta última, a literatura destaca a co-infecção entre *Mannheimia haemolytica* e *Mycoplasma bovis* (STIPKOVITS et al., 2000; THOMAS et al., 2002).

Os animais acometidos por infecções respiratórias por *P. multocida*, apresentam sinais inespecíficos, tais como depressão, perda de apetite, aumento de temperatura e mudanças no padrão respiratório (GRIFFIN, 2010). À necropsia, os animais apresentam importantes lesões pulmonares e tipos de exsudato que variam de acordo com os relatos publicados. A literatura destaca broncopneumonias cranioventrais, agudas a subagudas, com exsudato variando entre o fibrinoso ao fibrino-necrozante, na dependência do estágio da infecção (DABO; TAYLOR; CONFER, 2007) e, também, na presença de co-infecções, que podem agravar o quadro.

A taxa de isolamento de *P. multocida* varia entre animais sadios e doentes. Nos primeiros, reporta-se isolamento entre 20% e 60%, e o dobro em animais doentes (GRIFFIN et al., 2010). A alta taxa obtida nos animais sadios alerta para a possibilidade de esta espécie ser comensal e, portanto, parte da microbiota respiratória dos bovinos. Autio et al. (2007) obtiveram 34% de taxa de isolamento a partir de amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros na Finlândia. Já na Dinamarca, Angen et al. (2009) analisaram amostras de lavado transtraqueal através de cultivo e ensaios moleculares. Em animais sadios, obtiveram 43% de positividade e 82% em animais doentes, corroborando com o intervalo descrito por Griffin et al. (2010).

2.1.3.3 *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica pertence à Família Pasteurellaceae, Ordem Pasteurellales, Classe Preteobacteria e Gênero *Mannheimia*. É um coco bacilo Gram-negativo, anaeróbia facultativa e que, semeada em ágar sangue de carneiro, apresenta fraca hemólise. Na identificação bioquímica, destacam-se as seguintes características: é oxidase positiva, imóvel, indol negativa e fermentadora (GRIFFIN et al., 2010). Após os resultados publicados por Angen et al. (1999), sentiu-se a necessidade de revisar a taxonomia da então *Pasteurella haemolytica*, a qual foi reclassificada como integrante do Gênero *Mannheimia*. As principais diferenças bioquímicas dos Gêneros *Pasteurella* e *Mannheimia* são: a capacidade de fermentação de glicose e a incapacidade de utilizar a d-manose, ambas observadas somente no Gênero *Mannheimia*.

O Gênero *Mannheimia* apresenta cinco espécies: *granulomatis*, *glucosida*, *ruminalis*, *varigena* e *haemolytica*, sendo esta última, importante espécie relacionada com as doenças respiratórias dos bovinos. *M. haemolytica* contém 12 sorotipos capsulares: A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, AQ13, A14, A16 e A17, sendo o A2 o predominante em animais clinicamente saudáveis e o A1 nos doentes (GRIFFIN, 2010). É também considerada comensal, colonizando o trato respiratório superior. No momento em que essa relação com o hospedeiro é interrompida por fatores como estresse e co-infecções, o sorotipo A1 torna-se predominante, ocorrendo o desenvolvimento da broncopneumonia (HODGINS; SHEWEN, 2004). Esta espécie apresenta diversos fatores de virulência responsáveis pela infecção e pela evasão do sistema imune do hospedeiro. Cápsula, proteínas de membrana, adesinas, neuraminidase, LPS e leucotoxinas são responsáveis, respectivamente, pela invasão e aderência às células hospedeiras, resposta imune, colonização do hospedeiro, resposta inflamatória e lise leucocitária e plaquetária (GIOIA et al., 2006).

Embora faça parte do microbiota da nasofaringe (SCHNEE et al., 2011), *M. haemolytica* é considerada a espécie bacteriana de maior importância entre os patógenos envolvidos no CRB. Fatores que geram estresse tais como transporte, desmame e infecções virais, levam a imunossupressão e a mudanças no ambiente

respiratório, predispondo ao rápido crescimento desta bactéria, tornando-se a responsável pela infecção respiratória inferior e pelos sinais e sintomas observados. Os animais com infecção por *M. haemolytica* podem apresentar os sinais específicos e inespecíficos característicos das pneumonias. Theurer et al. (2013) ao estudar bezerros infectados experimentalmente com *M. haemolytica*, observaram temperatura corporal mais elevada que os animais controle, de modo que este dado poderia ser utilizado no monitoramento dos animais. Os bovinos infectados podem apresentar broncopneumonia cranioventral (THEURER et al., 2013) com exsudato fibrinoso e trombose de vasos linfáticos (RICE et al., 2007), septo interlobular edemaciado, necrose do parênquima e atelectasia (THEURER et al., 2013).

A determinação da presença esta espécie pode ser realizada pelo cultivo e identificação bioquímica, bem como por métodos moleculares.

2.1.4 Vírus

Os vírus são considerados agentes etiológicos primários, alterando a mucosa respiratória, a produção de citocinas e o funcionamento de células do sistema imune (BOSCH et al., 2013), predispondo a infecções secundárias por bactérias. As células da mucosa do trato respiratório podem ser alvos de desarranjo devido a replicação viral intracelular. A replicação, ainda, pode levar a lise celular, bem como a destruição destas por exaustão metabólica (BOSCH et al., 2013). A destruição da mucosa respiratória implica na exposição da fibronectina, induzindo a adesão (VAN DER FLIER et al., 1995).

A infecção viral afeta a produção de citocinas e, consequentemente, a função de células imunes. O vírus Influenza, por exemplo, é capaz de diminuir a resposta neutrofílica devido a produção inadequada de quimioatrativos (SHAHANGIAN et al., 2009). Sun e Metzger (2008) observaram a diminuição da susceptibilidade a infecções secundárias bacterianas após a inibição do IFN- γ , citocina produzida durante a infecção viral.

Existem ao menos quatro espécies virais importantes para a patogenia das doenças respiratórias nos bovinos, sendo eles: Vírus da diarreia viral bovina (VDVB), Herpesvírus bovino-1 (HVBo-1), Vírus respiratório sincicial bovino (VRSB) e

Parainfluenza bovina tipo-3 (PIb-3), sendo o que o Influenza vírus D (IVD) foi recentemente associado aos quadros e está sendo melhor estudado.

2.1.4.1 Vírus da diarreia viral bovina

Vírus da diarreia viral bovina (VDVB) é um importante micro-organismo para prática da clínica de ruminantes. É agente causador de diarreia, problemas reprodutivos, doença das mucosas e problemas respiratórios. Pertence à Família *Flaviviridae* e ao Gênero *Pestivirus*, assim como o Vírus da Febre Suína Clássica e o Vírus da Doença das Fronteiras, grupo viral com reação antigênica cruzada. Apresenta formato oval e pleomórfico, diâmetro de aproximadamente 120 nm (Figura 2) (HIRSH; ZEE, 2003). É um RNA vírus, com fita única, linear, cuja partícula viral apresenta envelope lipídico circundando o capsídeo (RIDPATH, 2010).

Figura 2 - Eletromicrografia demonstrando VDVB com formato oval e pleomórfico

Fonte: (<http://www.texcell.fr/viralclearance.html>)

É classificado de acordo com o genótipo, ou seja, de acordo com as diferenças no genoma e com o biótipo (no caso, a capacidade de ocasionar efeito citopático nas células por eles infectadas), relacionado às diferenças nas características expressas (RIDPATH, 2010). Os genótipos mais importantes são o VDVB-1 e VDVB-2, embora VDVB-3 vem sendo descrito na literatura e ganhando importância paulatinamente. VDVB-1 é o mais comumente encontrado nos

rebanhos, enquanto o VDVB-2 tem grande prevalência na América do Norte (OIE, 2015). De acordo com o biótipo, VDVB pode ser classificado como citopático, ou não citopático (RIDPATH, 2003), estando, portanto, relacionados com a capacidade de provocar alterações estruturais e bioquímicas nas células infectadas. Por ser um RNA vírus, o VDVB é mais predisposto a sofrer alterações genéticas ocasionadas por mutações. Enquanto os genótipos e sub-genótipos são formados a partir de múltiplas inserções errôneas de bases nitrogenadas (mutações pontuais), a recombinação é responsável pela formação dos biótipos (MEYERS et al., 1991; KÜMMERER et al., 2000).

A transmissão deste vírus pode ocorrer por aerossóis e contato com animais infectados, especialmente os persistentemente infectados (PI), grupo considerado como o maior responsável pela transmissão do VDVB (RIDPATH, 2010). O primeiro sítio de colonização é a mucosa nasal e, pelos vasos linfáticos, o vírus é espalhado para outros tecidos, tais como reprodutivo, intestinal e respiratório. A infecção por VDVB tem características diferentes conforme o momento da exposição dos animais ao vírus.

A infecção transplacentária é característica de fêmeas não imunizadas, expostas ao vírus (RADOSTITS, 2002). Em fêmeas expostas no primeiro terço da gestação, observam-se perda embrionária bem como morte fetal. Em rebanhos com muitas fêmeas apresentando exposição neste momento inicial da gestação, observa-se queda nas taxas de concepção. Fetos não imunocompetentes expostos ao vírus não citopatogênicos tornam-se persistentemente infectados e soronegativos. Entretanto, após a infecção por outros genótipos ou exposição vacinal, os animais podem tornar-se soropositivos (NETTLETON, 1995). Os animais PI são os que mais sucumbem a Doença das Mucosas, quando da superinfecção por biótipos homólogos ao vírus persistente. Geralmente ocorrem em animais de dois a seis anos de idade que apresentam diarreia profusa, em alguns momentos sanguinolenta, e erosões digestivas (BAKER, 1995). Em fêmeas expostas entre 100 e 150 dias de gestação, observa-se nascimento de bezerros fracos, com malformações neurológicas e esqueléticas, tais como hidrocefalia e hipoplasia cerebelar (BAKER, 1995). Por fim, fêmeas infectadas ao final da gestação apresentam bezerros aparentemente saudáveis e que, por serem imunocompetentes, desenvolvem eficiente resposta imune, apresentando, portanto, anticorpos pré-colostrais (BROWNLIE; CLARKE; HOWARD, 1989).

Assim como os demais vírus envolvidos nas doenças respiratórias, VDVB pode ser causa primária do CRB (RIDPATH, 2010), embora as infecções secundárias sejam mais corriqueiras. O vírus é capaz de facilitar a infecção por outros micro-organismos devido a mecanismos como sinergismo e imunossupressão, os quais são ativados dependendo do micro-organismo presente (RIDPATH, 2010)

O estudo da prevalência da diarreia viral bovina é amplamente realizado nos mais diversos países. No Brasil, observam-se prevalências que chegam a 85% (PIOVESAN et al., 2013). Na região sul do país, Quincozes et al. (2007) observaram prevalência de 66,32% no Rio Grande do Sul. Pasqualotto, Sehnem e Winck (2015) observaram prevalência de 28,5% em animais no Estado de Santa Catarina. Na região centro-oeste, Brito et al. (2010) relataram prevalência de 64% bovinos não vacinados em Goiás. Na região sudeste, Samara, Dias e Moreira (2004) observaram ocorrência de VDVB de 57,56% e 56,49% nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo, respectivamente.

O diagnóstico pode ser realizado por meio da detecção do antígeno, utilizando isolamento viral e ELISA, bem como detecção de anticorpos por ELISA e vírusneutralização (OIE, 2015).

A vírusneutralização (VN) é considerada a técnica padrão para detecção de anticorpos anti-VDVB. É sensível e específica, laboriosa e necessita de laboratórios e laboratoristas capacitados para trabalho com cultivo celular. Para esta técnica, é importante o uso de um vírus com características antigênicas similares ao presente na população a ser testada (SANDVIK, 1999). Baseia-se na observação da inibição da capacidade do vírus em infectar as células e nelas, provocar efeito citopático. A estirpe viral frequentemente utilizada é a VDVB-1 NADL, embora seja possível o uso de outras estirpes como Oregon C24V (FULTON et al., 2005).

2.1.4.2 Herpesvirus bovino tipo-1

Herpesvírus bovino tipo 1 (HVBo-1), isolado pela primeira vez nos Estados Unidos (MADIN; YORK; MCKERCHER, 1956) é o agente etiológico de três importantes enfermidades dos bovinos: rinotraqueíte infecciosa bovina, vulvovaginite

pustular infecciosa e balanopostite infecciosa. Pertence ao Gênero *Varicellovirus*, Família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, e Ordem *Herpesvirales* (ICTV, 2014). É um vírus de DNA dupla fita, classificado em subtipos 1.1, 1.2a e 1.2b (com reatividade sorológica cruzada) de acordo com as características genótípicas e antigênicas (METZLER et al., 1985), estando relacionados às duas enfermidades anteriormente descritas. O subtipo 1.1 é o mais prevalente no Brasil, quando da presença de problemas respiratórios (D'ARCE et al., 2002). A morfologia deste herpesvirus depende da integridade do envelope vírico (estrutura lipídica derivada de membrana plasmática) (Figura 3), interferindo, também, no diâmetro da partícula viral, a qual varia entre 120-300 nm de diâmetro. Enquanto as partículas virais com o envelope íntegro apresentam morfologia quase esférica, àquelas com envelope rompido apresentam formato de “ovo frito” (ROIZMAN; PELLETT, 2001).

Figura 3 - Componentes estruturais da partícula viral dos herpesvirus. Comparação entre microeletrofotografia (à esquerda) e desenho esquemático (à direita)

Fonte: (METTENLEITER, 2003), adaptado.

A principal característica desta ordem é a capacidade de levar a infecções latentes. Em situações de estresse, tais como transporte, lactação, parto e administração exógena de corticoides, ocorre a reativação da infecção, e consequente transmissão do vírus. A infecção latente está relacionada a presença do DNA viral no gânglios paravertebrais e trigêmeo, após disseminação viral pelo transporte neuronal pelos axônios (ACKERMANN; WYLER, 1984). Os animais tornam-se portadores inaparentes, havendo eliminação viral esporádica,

contribuindo para a permanência e disseminação do vírus no rebanho (MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000).

HVBo-1 pode ser transmitida através de aerossóis, contato direto ou indireto com secreções ocular, genital ou naso-faríngeal, bem como por monta natural ou inseminação artificial, dado a eliminação do vírus pelo sêmen. Dentre as manifestações clínicas verificadas na presença de vulvovaginite pustular infecciosa, destacam-se vulva hiperêmica e edemaciada, presença de vesículas presentes na mucosa vaginal e abortamentos (FRANCO; ROEHE, 2007). Os animais jovens são os mais frequentemente acometidos pela IBR, apresentando sinais clínicos inespecíficos tais como febre, inapetência e depressão, além de secreção nasal mucopurulenta. Após a multiplicação do vírus na mucosa nasal, o tecido torna-se hiperêmico, com posterior presença de pústulas locais, de difícil observação, podendo evoluir para presença de grandes áreas hemorrágicas (OLIVEIRA, 2011). É comum a presença de infecção secundária por outros vírus como o VDVB e as bactérias citadas anteriormente.

O estudo da prevalência de herpesvirus bovino tipo 1 é realizado continuamente no Brasil, principalmente para a investigação de enfermidades reprodutivas presentes nos rebanhos. O país apresenta prevalências entre 41,9% e 92,95% (MÉDICI et al., 2000; POLETO et al., 2004). Em outros países, a prevalência do HVBo-1 também é alta. Na Bélgica, Boelaert et al. (2000) observaram 67% de animais positivos. Na América do Sul, Guarino et al. (2008) e Carbonero et al. (2011) relataram 37% e 43,2% de prevalência no Uruguai e Equador, respectivamente. Na Índia, Nandi et al. (2011) observaram 39,2%. Por fim, 48,28% dos animais apresentaram anticorpos para HVBo-1 na Zâmbia (MWEENE et al., 2003).

O diagnóstico da infecção pode ser realizado por meio da detecção do antígeno, por isolamento viral e detecção do ácido nucleico (Real Time PCR) e do anticorpo, por testes sorológicos, como ELISA e vírus neutralização. Estes, por sua vez, são amplamente utilizados já que, dado a latência viral característica da infecção, a presença de animais soropositivos indica status de infecção (OIE, 2010).

2.1.4.3 Vírus respiratório sincicial bovino

O vírus Respiratório Sincicial Bovino (VRSB) pertence a ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae* e gênero *Pneumovirus* (ICTV, 2014). É envelopado e apresenta RNA de fita simples negativa. Possui duas importantes determinantes para o início da infecção, proteínas: F e G (Figura 4).. Enquanto a proteína F promove a formação de sincícios através da fusão entre as células, permitindo a propagação viral, a proteína G é responsável pela adesão às células do hospedeiro e, devido a recorrentes mutações na região que codifica a proteína G, leva ao aparecimento de quasipécie (GERSHWIN, 2007).

Figura 4 - Morfologia do Vírus Respiratório Sincicial Bovino

Fonte: (VALARCHER; TAYLOR, 2007), adaptado

Pertencente ao mesmo gênero que o Vírus Respiratório Sincicial Humano, o VRSB é um dos mais importantes agentes relacionados ao complexo respiratório bovino. Foi isolado e identificado pela primeira vez em 1970 na Suíça (PACCAUD; JACQUIER, 1970). Com maior susceptibilidade dos animais mais jovens (SARMIENTO-SILVA; NAKAMURA-LOPEZ; VAUGHAN, 2012), relatam-se índices de mortalidade entre 2% e 20% ao redor do planeta (GERSHWIN, 2007).

As manifestações clínicas em animais adultos são mais leves que em bezerros. A infecção se caracteriza por sinais comuns a problemas respiratórios por

outros agentes, tais como, depressão, tosse, anorexia, taquipneia e temperatura acima de 40° C. À necropsia, observam-se áreas de consolidação pulmonar e enfisema nos casos mais severos (GERSHWIN, 2007). Em parte dos animais acometidos, é possível detectar respiração abdominal, além de ruídos pulmonares anormais (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A transmissão pode ocorrer via aerossol, introdução de animais infectados em rebanhos livres da doença, além de higiene inadequada. Relata-se que o uso de um único calçado durante a visita em diferentes propriedades, pode transmitir o vírus entre os rebanhos (OHLSON et al., 2010). Outros fatores de risco associados à infecção tais como idade, presença de animais silvestres e altitude em que a propriedade está localizada (SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; OHLSON et al., 2010; SAA et al., 2012). Embora a principal fonte de infecção sejam os bovinos, infecções experimentais em ovinos destacam esta espécie como uma possível e importante fonte (MASOT et al., 2000), principalmente na existência de produção consorciada de bovinos com esta espécie.

Embora existam trabalhos que relatem animais com infecção confirmada por VRSB (DRIEMEIER et al., 1997), somente um trabalho descreve a ocorrência de anticorpos contra VRSB, no Brasil. Ao estudar três propriedades no Estado de São Paulo, Affonso et al. (2011) observaram prevalências entre 46% e 84%, indicando uma possível importância deste vírus nos problemas respiratórios no estado.

Fora do país, entretanto, a ocorrência de anticorpos contra o vírus é largamente estudada. No continente americano, estudos foram conduzidos no México e no Equador, indicando a importância deste vírus nesses países. No México, Solís-Calderón et al. (2007) e Figueroa-Chávez et al. (2012) obtiveram ocorrência de 51% e 91%, respectivamente. Já no Equador, 80,48% dos animais do estudo de Saa et al. (2012) apresentaram anticorpos contra o VRSB. No continente europeu, Dinamarca, Estônia e Bélgica também conduziram estudos de prevalência e observaram positividade em 54%, 49% e 20% dos animais estudados (UTTENTHAL et al., 2000; RAAPERI et al., 2010; PARDON et al., 2011).

O diagnóstico da infecção pode ser realizado por meio da detecção do antígeno, por isolamento viral células MDBK (DRIEMEIER et al., 1997) e detecção do ácido nucleico (Real Time PCR) e/ou por detecção do anticorpo, por testes sorológicos, como ELISA e vírus neutralização.

2.1.4.4 Vírus Parainfluenza bovina tipo-3

Parainfluenza bovina tipo-3 (PIb-3) pertence à ordem *Mononegavirales* e família *Paramyxoviridae* (ICTV, 2014), estando genética e antigenicamente relacionado ao Parainfluenza humano tipo-3, bem como o vírus Sendai, encontrados em ratos (MURPHY et al., 1999). Apresenta genoma composto por RNA fita simples não segmentada, o qual codifica sete proteínas, com destaque para algumas proteínas de envelope, tais como Hemaglutinina-neuroaminidase (HN) e proteína de fusão (F), as quais estão envolvidas na ligação aos receptores e hemaglutinação de hemácias e na penetração às células do hospedeiro, respectivamente (ELLIS, 2010). São pleomórficos e envelopados, com diâmetro de 150 a 200nm e classificados em três sorotipos - A, B e C- de acordo com análises filogenéticas (NEILL; RIDPATH; VALAYUDHAN, 2015).

O primeiro isolamento ocorreu em 1959 nos Estados Unidos da América, após estudo com amostras de descarga nasal de bovinos diagnosticados com “febre dos transportes” ou “shipping fever” (REISINGER; HEDDLESTON; MANTHEI, 1959). No Brasil, existem somente dois relatos sobre o isolamento deste vírus, sendo o primeiro em amostras de pulmão bovino (CANDEIAS; SUGAY; RIBEIRO, 1971) em São Paulo, e o segundo, em amostras de secreção nasal no Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 2003).

A transmissão ocorre por inalação da partícula viral, a qual apresenta tropismo por células que possuem alta concentração de ácido siálico, (células traqueais e ciliadas brônquicas, células bronquiolares e pneumócitos tipo I e II), substrato para a atividade da neuroaminidase (ELLIS, 2010). Estudos indicam que após a ligação com ácido siálico, o complexo HN interage com a proteína F, resultando em fusão entre o envelope viral e a membrana celular do hospedeiro, permitindo a entrada do material genético viral (KARRON; COLLINS, 2007). Como consequência, ocorre a replicação viral, a qual resulta na redução da camada epitelial, perda de cílios, descamação de células superficiais e formação de sincícios (CAMPBELL et al., 1969), modificações que elevam a probabilidade de infecções bacterianas secundárias.

Animais com Parainfluenza bovina tipo 3 apresentam desde infecções assintomáticas a severas pneumonias. Embora a literatura destaque a dificuldade em se determinar o patógeno responsável pela infecção somente pela observação dos sinais clínicos, Allan et al. (1978) referem que a tosse seca é o primeiro sinal clínico observado em surtos de pneumonia pelo vírus, além de aumento da temperatura corporal. Destaca-se, ainda, a presença de descarga nasal mucopurulenta e inapetência (ELLIS, 2010), além de taquipneia, febre e lacrimejamento. Os animais acometidos apresentam lesões pulmonares, tais como atelectasia e consolidação, principalmente em lobos craniais, áreas avermelhadas e até exsudato mucopurulento observado ao corte (BRYSON et al., 1999). Radostits, Blood e Gay (2002), ainda, referem que a infecção por este vírus diminui o *clearance* de *P. multocida* no pulmão, sendo uma forte evidência que confirma que a presença deste vírus predispõe a infecções bacterianas secundárias.

Anticorpos contra Parainfluenza Bovina Tipo 3 já foram detectados em diversos países. Na Nigéria, observou-se 51,73% de animais positivos (IBU et al., 2005). Já no México, o levantamento sorológico realizado por Solís-Calderón et al. (2007) detectou 85,6% de positividade. Em território belga, no estudo para detectar a prevalência dos principais patógenos respiratórios em bezerros, conduzido por Pardib et al. (2011), detectou-se anticorpos contra o Parainfluenza bovino tipo 3 em 53,3% dos rebanhos estudados. Com o objetivo de estimar a soroprevalência do vírus em rebanhos do Irã, Ezzi et al. (2013) detectaram 77,02% de positividade.

No Brasil, são poucos os trabalhos que avaliaram a prevalência de anticorpos contra Parainfluenza Bovina tipo 3. O primeiro estudo foi realizado no Estado de São Paulo, onde houve detecção de 36,71% de amostras positivas (CANDEIAS; RIBEIRO, 1968). No Estado da Bahia, Sardi et al. (2002) detectaram 68,5% de animais reagentes por meio da técnica de inibição da hemaglutinação. Ainda, foi detectado em ovinos, no estudo conduzido no Estado de São Paulo por Gonçalves et al. (2009).

O diagnóstico pode ser realizado por meio de testes indiretos, tais como virusneutralização, Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e teste de inibição da hemaglutinação além de testes para detecção do antígeno, tais como isolamento

viral e ensaios moleculares (FLORES, 2007), somado a observação dos sinais clínicos.

2.1.4.5 Influenza vírus D

O Influenza vírus pertence a família *Orthomyxoviridae* (ICTV, 2014) que apresenta uma única fita de RNA sentido negativo. É reconhecidamente dividido em 3 gêneros: *Influenzavirus A*, que é relacionado a infecção de mamíferos, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*, os quais apesar de muito específicos para seres humanos (KATAGIRI; OHIZUMI; HOMMA, 1983), já foram isolados a partir de amostras suínas (GUO et al., 1983). Recentemente, um vírus com 50% de homologia com o Influenza C humano foi isolado de suínos, (HAUSE et al., 2013) e bovinos (COLLIN et al., 2015), sendo inicialmente denominados como C/swine/Oklahoma/1334/2011 (C/OK). Após análises filogenéticas e sorológicas, foram classificados em um novo gênero, o Influenza vírus D (IVD).

Estudos recentes reforçam a hipótese de que os bovinos seriam os reservatórios naturais destes vírus. Hause et al. (2013) verificaram que 9,5% dos suínos estudados apresentavam títulos de anticorpos contra C/OK detectáveis. Já Hause et al. (2014) relatam que somente 1,3% dos soros humanos estudados apresentaram títulos detectáveis. Esses resultados indicariam que nem suínos e nem humanos seriam os reservatórios naturais deste vírus. Em bovinos, este vírus já foi detectado em bovinos na Itália, (CHIAPPONI et al., 2016), França (DUCATEZ; PELLETIER; MEYER, 2015) e Estados Unidos (HAUSE et al., 2013; FERGUSON et al., 2015). No estudo conduzido por MITRA et al. (2016 no prelo)¹, obteve-se uma tendência de associação entre a emergência do IVD e as doenças respiratórias bovinas. Evidência sorológica da exposição de pequenos ruminantes ao IVD foi observada por Quast et al. (2015), sendo 5,2% em ovinos e 8,8% em caprinos estudados nos Estados Unidos e Canadá.

¹ MITRA, N.; CERNICCHIARO, N.; TORRES, S.; LI, F.; HAUSE, B. M. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. **Journal of General Virology**, 5 maio 2016. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000492.v1>>. Acesso em: 02 ago. 2014. no prelo.

Pouco é sabido sobre a patogênese deste vírus nos bovinos. No estudo conduzido por Ferguson et al. (2016), observou-se que o IDV é responsável por uma doença respiratória mediana, que leva a infiltração de linfócitos no epitélio traqueal e que pode ser transmitido por contato direto. Outros estudos são necessário a fim de se melhor caracterizar a infecção respiratória pelo IDV.

Diante do exposto, têm-se bem estabelecido que a broncopneumonia é uma enfermidade respiratória de importância clínica e econômica para a produção de bovinos, acometendo animais de todas as idades, principalmente os mais jovens. Além de serem poucos os estudos brasileiros que avaliam as características microbiológicas do sistema respiratório de bovinos acometidos por problemas nesta sistema (GONÇALVES, 1987; BARROS et al., 1994; BENESI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2016) e da dificuldade de determinar o agente etiológico somente pelas manifestações clínicas, não existem trabalhos que avaliam essa problemática dentro de assentamentos brasileiros.

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi determinar a prevalência de *M. bovis*, *M. díspar*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *P. multocida*, *M. haemolytica*, Parainfluenza Bovino tipo-3 (PIb-3) e Influenza vírus D (IVD) e a prevalência de anticorpos contra Vírus da Diarreia Viral Bovina (VDVB), Herpesvírus tipo -1 (HVBo-1) e o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (VRSB) em bezerros saudáveis e com broncopneumonia criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante de Paranapanema - SP. Além disso, objetivou-se avaliar a associação destes micro-organismos com a presença da broncopneumonia e dos sinais e sintomas apresentados pelos animais durante a avaliação física.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por meio de isolamento e identificação bioquímica a presença de *P. multocida* e *M. haemolytica* em bezerros saudáveis e com broncopneumonia criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante de Paranapanema - SP.
- Avaliar por meio de isolamento, identificação bioquímica e PCR convencional a presença de *M. díspar*, *M. bovis* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC em bezerros saudáveis e com broncopneumonia criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante de Paranapanema - SP.
- Avaliar por meio de PCR em Tempo Real (qPCR) a presença de Parainfluenza Bovina tipo-3 e Influenza vírus D em bezerros saudáveis e com broncopneumonia criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante de Paranapanema - SP.

- Avaliar por meio de vírus neutralização a presença de anticorpos contra Vírus da Diarreia Viral Bovina (VDVB), Herpesvirus Bovino tipo 1(HVBo-1) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (VRSB) em bezerros sadios e com broncopneumonia criados nos assentamentos de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante de Paranapanema - SP.
- Relacionar os perfis de saúde (sadio e com broncopneumonia) obtidos por meio de exame físico dos bezerros com os achados microbiológicos e sorológicos.
- Relacionar os sinais e sintomas apresentados pelos bezerros durante o exame físico com os dados obtidos nos isolamentos e identificações bioquímicas, nas PCRs e nas vírus-neutralizações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O estado de São Paulo fica localizado na região sudeste do Brasil. É composto por 645 municípios e uma área total de 248.222.362 Km². A população bovina deste estado é de aproximadamente 10.126.223 animais, dos quais 1.287.509 são bovinos leiteiros (IBGE, 2014).

O Pontal do Paranapanema está localizado no extremo oeste do estado de São Paulo, possuindo 32 municípios (Figura 5). A Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP) atende 95 assentamentos localizados em 13 municípios. O presente estudo foi realizado nos municípios de Caiuá (249 produtores), Presidente Epitácio (256 produtores) e Mirante do Paranapanema (632 produtores), totalizando aproximadamente 1.137 produtores de leite (ITESP, 2010-2011). As propriedades são caracterizadas apresentarem até 10 hectares, com criação semi-intensiva composta por 01 a 200 animais, que recebem pastagem como alimentação durante todo o ano.

Figura 5 - Caracterização da área de estudo

Fonte: (vivapontal.wordpress.com; cátedra,editoraunesp.com.br), modificado

4.2 AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado entre Agosto de 2014 a fevereiro de 2015 nos municípios de Caiuá, Presidente Epitácio e Mirante do Paranapanema, extremo oeste do estado de São Paulo. Com o objetivo de se determinar o número de animais a serem estudados, foi realizado um desenho amostra em dois estágios, sendo o primeiro relacionado ao número de propriedades que foram visitadas e o segundo, ao número de animais amostrados em cada propriedade, com utilização da ferramenta EpiTools: Epidemiological Calculator (SERGEANT; ESG, 2015). Para o cálculo, definiu-se como parâmetros de desempenho dos testes diagnósticos a serem utilizados: sensibilidade e especificidade de no mínimo 80%. Assumiu-se, em animais e nas propriedades, prevalência esperada de 50% e 10%, respectivamente, com nível de confiança de 95%. Desta maneira, foram visitadas quarenta e duas propriedades distribuídas proporcionalmente nas regiões, com a coleta de amostras provenientes de quatro animais em cada totalizando 168 animais a serem estudados.

A tabela 1 apresenta o número de propriedades visitadas em cada município, bem como o total de amostras coletadas. Mirante de Paranapanema foi o município com maior número de propriedades visitadas e de amostras coletadas.

Tabela 1 - Distribuição de amostras coletadas e de propriedades visitadas nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Municípios	Número de Propriedades N(%)	Número de amostras N(%)
Caiuá	06 (14,3)	22 (13,9)
Presidente Epitácio	13 (54,8)	50 (54,5)
M. de Paranapanema	23 (30,9)	86 (31,6)
Total	42 (100,0)	158 (100,0)

Fonte: Gaeta, N.C. (2016)

4.3 EXAME FÍSICO

A fim de classificar os animais em sadios e doentes, foram utilizados os métodos descritos por Rosenberger (1993) para avaliação do estado geral, parâmetros vitais, grau de hidratação, coloração de mucosas aparentes e para o exame específico do sistema respiratório, com posterior compilação dos dados em ficha clínica (Anexo C).

4.4 AMOSTRAS

4.4.1 Soro

As amostras foram obtidas por venipunção da veia jugular externa, com coleta de 8mL de sangue utilizando sistema a vácuo (BD vacutainer® seco). Os tubos foram centrifugados a 600 x g durante quinze minutos para obtenção do soro, os quais foram acondicionados em microtubos (Eppendorf®) e congelados até o momento da análise.

4.4.2 Lavado Traqueobrônquico

Com o animal em estação, foi realizada a tricotomia da região do terço médio da traqueia, e posterior antisepsia, utilizando álcool 70°, clorexidine e iodopovidona. Em seguida, uma sonda do tipo Intracath® (BD, USA) foi introduzida por traqueocentese até a região brônquica. Foram instilados 20 mL-40 mL de solução fisiológica 0,9% estéril (Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil), com posterior

aspiração do lavado, resultando em 2 a 5 mL de fluido aspirado. As amostras foram divididas em três alíquotas:

- A primeira, adicionada em criotubos contendo 500 µL de meio de transporte para micoplasmas (Anexo A) e 500 µL de crioprotetor (glicerol), com acondicionamento em nitrogênio líquido até o momento do processamento no Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;
- A segunda, adicionada em tubos de ensaio contendo caldo BHI (BD Difco™, USA) para cultivo bacteriano, acondicionada sob refrigeração até o momento do processamento no Laboratório de Bacteriologia Geral o Instituto Biológico de São Paulo;
- A terceira, aliqüotada em criotubo seco e acondicionada em nitrogênio líquido até o momento do processamento no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.5 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

4.5.1 Cultura e identificação de bactérias aeróbias

As amostras de lavado traqueobrônquico aliqüotadas em meio BHI (Brain Heart Infusion, Himedia®), foram incubadas em estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Em seguida, 10 µL foram plaqueados em meio Ágar sangue e incubados em aerofilia a 37°C por 48 horas. Após a observação das placas, as colônias foram caracterizadas por sua morfologia, cor, odor e presença de hemólise. Fez-se a prova da catalase e a coloração de Gram com o objetivo de classificá-las e dar seguimento a identificação.

As bactérias classificadas como bacilos ou cocobacilos Gram positivas foram plaqueadas em meio Triple Sugar Iron – TSI (Himedia®), incubadas em aerofilia a 37°C por 24 horas e realizou-se o teste da oxidase. Com os resultados, outros testes para confirmação da espécie foram realizadas, com o auxílio dos protocolos

descritos por Koneman et al. (2008). Bactérias coco Gram positivas e catalase positivas foram classificadas como *Staphylococcus sp.*. A espécie foi determinada pelas provas de fermentação de manitol (Himedia®), sensibilidade a Polimixina B (DME®), ambas as placas incubadas em aerofilia a 37°C por 24 horas e a prova da coagulase (Laborclin®). Já as bactérias coco Gram positivas e catalase negativas foram classificadas como *Streptococcus sp* e a determinação da espécie não foi realizada.

Bactérias Gram negativas foram plaqueadas em meio EMB Levine (Himedia®) e em meio Triple Sugar Iron – TSI (Himedia®), ambas incubadas em aerofilia a 37°C por 24 horas. A prova da oxidase também foi realizada. Com os primeiros resultados, provas bioquímicas foram conduzidas, até obter a identificação da espécie (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2008).

Pasteurella multocida e *Mannheimia haemolytica* são espécies importantes na etiologia das doenças respiratórias de bovinos. Características como morfologia colonial, coloração de Gram, crescimento em ágar EMB Levine e as provas da oxidase e catalase são importantes para determinação presuntiva destas espécies (Quadro 1)

Quadro 1 -Características presuntivas para determinação de *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica*

Espécie	Colônia	Color. Gram	Cesc. EMB Levine	Oxidase	Catalase
<i>P. multocida</i>	Redondas acinzentadas s/ hemólise	CB negativo	Ausente	Positiva	Positiva
<i>M. haemolytica</i>	Redondas acinzentadas c/ hemólise	CB negativo	Presente	Positiva	Positiva

Fonte: Quinn et al. (2005)

4.5.2 Detecção de micoplasmas

4.5.2.1 Cultivo e isolamento

Foi utilizado o meio SP4 (TRULLY, 1995) (Anexo B) com pH variando entre 7,4 a 7,6. Foram utilizadas placas contendo 5 mL do meio sólido e tubos de ensaio contendo 2 mL do meio líquido. Depois de descongeladas, alíquotas de 25 µL de cada amostra foram plaqueadas em meio sólido (Figura 1) e 100 µL adicionados em meio líquido. A fim de eliminar vieses como a grande quantidade de células do trato respiratório, as quais dificultam a leitura das placas, e a possibilidade de crescimento de bactérias contaminantes, que podem impedir o crescimento dos micoplasmas, as amostras foram filtradas utilizando filtro estéril para seringa Nylon 30 mm 0,45 µm (JetBiofil, Shanghai, China) (Figura 2). As placas e os tubos foram encubados em estufa em aerofilia à 37°C com acompanhamento diário durante 15 dias.

Durante a leitura das placas em microscópio atentou-se para a mudança de coloração do indicador de pH do meio líquido (vermelho de fenol) e para busca por colônias com aspecto de “ovo frito”, em meio sólido. Os isolados foram obtidos a partir de dois repiques consecutivos de colônias isoladas e a identificação da espécie realizada por PCR convencional.

4.5.2.2 Extração de DNA

O material genético foi obtido por meio do método de extração por fervura descrita por Fan et al. (1995). Utilizou-se 1 mL das amostras de lavado traqueal, o qual foi centrifugado a 220 x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada (Boeco, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com 200 µL de PBS (2,6 mM NaH₂PO₄, 7,4 mM NaHPO₄, 10 mM NaCl, pH 7,2), e centrifugações a 220 x g por 5 minutos. Após a segunda lavagem, o sedimento obtido foi ressuspensionado em 20 µL do mesmo tampão e colocado em banho-maria seco (Nova Instruments, Piracicaba, Brasil) à 100°C por 10 minutos e imediatamente após, em gelo por 5 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 220 x g por 10 minutos e o sobrenadante acondicionado em microtubos de 0,6 mL (Quiagen, Limburgo, Países Baixos) à -4°C até o momento do processamento.

4.5.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional

4.5.2.3.1 PCR para determinação da classe *Mollicutes*

A PCR para determinação da classe *Mollicutes*, também denominada PCR “genérica” tem como iniciadores, *primers* complementares a sequência de oligonucleotídeos do gene 16S do RNA ribossômico dos gêneros pertencentes à Classe *Mollicutes*, descrito por Van Kuppeveld et al. (1992) (Quadro 2). A PCR genérica foi realizada em todas as amostras e isolados, como método de triagem.

Quadro 2 -Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da Classe *Mollicutes*, sequências e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Sequências	Produto
MGSO	5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'	270pb
GPO3	5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3'	

Fonte: Van Kuppeveld et al. (1992).

A reação foi elaborada para um volume final de 50 µL, constituída por: 5,0 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 2,0 µL MgCl₂ (50 mM); 8 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 0,8 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol), 0,2 µL de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) e 2 µL de DNA cromossomal. O ciclo de amplificação foi estabelecido por Van Kuppeveld et al. (1992) e é descrito por: 1 ciclo por 5 minutos à 94°C; 34 ciclos à 94°C por 30 segundos, 57,7°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos. O material amplificado foi acondicionado à 4°C até o momento da eletroforese.

4.5.2.3.2 PCR específico para *Mycoplasma bovis*

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são complementares a sequência do gene 16S do RNA ribossômico da espécie *Mycoplasma bovis*, descrito por

González et al. (1995) (Quadro 3). A PCR específica para esta espécie foi realizada somente nas amostras positivas na PCR genérica.

Quadro 3 -Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da espécie *M. bovis*, sequências e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Sequências	Produto
MBoF	5'-CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG-3'	360 pb
MBoR	5'-CCG TCA AGG TAG CAT CAT TCC CTAT-3'	

Fonte: (GONZÁLEZ et al., 1995)

A reação foi preparada para um volume final de 50 µL: 5 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 1,5 µL MgCl₂ (50 mM); 1 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol), 0,4 µL de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen™), 35,1 µL água livre de DNase estéril e 6 µL de DNA cromossomal. O ciclo de amplificação foi estabelecido por Marques et al. (2008) e é descrito por: 1 ciclo por 5 minutos à 94°C; 35 ciclos à 94°C por 45 segundos, 55,0°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e 1 ciclo final à 72°C por 5 minutos. O material amplificado foi acondicionado à 4°C até o momento da eletroforese.

4.5.2.3.3 PCR específico para *Mycoplasma díspar*

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são complementares a sequência do gene 16S do RNA ribossômico da espécie *Mycoplasma díspar*, descrito por Marques et al. (2007) (Quadro 4). A PCR específica para esta espécie foi realizada somente nas amostras positivas na PCR genérica.

Quadro 4 -Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da espécie *M. díspar*, sequências e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Sequências	Produto
MDF	5'-TTA AAG CTC CAC CAA AAA-3'	433 pb
MDR	5'-GTA TCT AAA GCG GAC TAA A-3'	

Fonte: Marques et al. (2008)

A reação foi preparada para um volume final de 50 µL: 5 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 2,0 µL MgCl₂ (50 mM); 1 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol), 0,4 µL de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen™), 38,6 µL de água livre de DNase estéril e 1 µL de DNA cromossomal. O ciclo de amplificação foi estabelecido por Marques et al. (2007b) e é descrito por: 1 ciclo por 5 minutos à 94°C; 35 ciclos à 94°C por 1 minuto, 53,6°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 1 ciclo final à 72°C por 5 minutos. O material amplificado foi acondicionado à 4°C até o momento da eletroforese.

4.5.2.3.4 PCR específico para *Micoplasma mycoides subsp. mycoides SC*

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são complementares a sequência do gene 16S do RNA ribossômico da espécie *Micoplasma mycoides subsp. mycoides SC*, descrito por Dedieu (1994) (Quadro 5). A PCR específica para esta espécie foi realizada somente nas amostras positivas na PCR genérica.

Quadro 5 -Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de bactérias da espécie *M. mycoides subsp. mycoides SC*, sequências e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Sequências	Produto
MSC1	5'-ATA CTT CTG TTG TAG TAA TAT G-3'	270pb
MSC2	5'-CTG ATT ATG ATG ACA GTG GTC A-3'	

Fonte: Dedieu (1994).

A reação foi preparada para um volume final de 50 µL: 5,0 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 1,5 µL MgCl₂ (50 mM); 1,0 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol), 0,2 µL de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) e 2,0 µL de DNA cromossomal. O ciclo de amplificação foi estabelecido por Dedieu et al. (1994) e é descrito por: 40 ciclos à 92°C por 1 minuto, 53,0°C por 1 minuto e 72°C por 2

minuto e 1 ciclo final a 72°C por 5 minutos. O material amplificado foi acondicionado à 4°C até o momento da eletroforese.

4.5.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Os amplificados obtidos pela PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, utilizando tampão tris-acetato-EDTA (TAE) e marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Invitrogen™). A visualização dos produtos foi realizada sob luz ultravioleta por meio do Transiluminador Vilber Lourmat®.

4.5.2.5 Cepas de Referência

As cepas de referências utilizadas como controle positivo nas reações foram: *Mycoplasma bovis* Donetta, *Mycoplasma díspar* M29/79 e *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* PG1 pertencentes ao Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Para controle negativo, utilizou-se PBS 1x.

4.5.3 Detecção de anticorpos contra VDVB, HVBo-1 e VRSB

4.5.3.1 Vírus da diarreia viral bovina

Para a reação de soro-neutralização, placas de micro titulação com 96 cavidades de fundo chato (TPP- Techno Plastic Products AG, Switzerland) foram utilizadas com os seguintes objetivos: reação, controle de soro, controle de doses e retrotitulação.

Nas placas correspondentes a reação, adicionou-se 100µL de MEM (Meio Essencial Mínimo, Cultilab, Campinas, Brasil) na coluna um - correspondente ao controle de células - e 160 µL nas fileiras A e E - correspondentes ao local onde as amostras são adicionadas. Após a adição de 40 µL de cada amostra, 50 µL de cada poço da fileira A foram passados para a fileira B, repetindo o procedimento até a fileira H. A esta reação, outras duas placas foram adicionadas: a correspondente ao controle do soro e a outra, às doses. Na primeira placa, 100 µL de meio MEM foram adicionados a coluna um, e 40 µL os soros controle em duplicata na seguinte ordem: forte positivo, médio positivo, fraco positivo e negativo. Na segunda placa, 100 µL de meio MEM foram adicionados às colunas onze e doze, e nas demais, 40 µL das doses virais correspondentes a 1,56 DICTs, 3,125 DICTs, 6,25 DICTs, 12,5 DICTs, 25 DICTs, 50 DICTs, 100 DICTs, 200 DICTs, 400 DICTs e 500 DICTs, respectivamente nas colunas um a dez.

Todas as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C por uma hora. Em seguida, todas as placas receberam 50 µL de células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) na concentração de 2X10⁵ células/mL, exceto nas colunas de controle de soro das placas de reação e nas colunas cinco e dez da placa controle, as quais ficam completamente vazias. Ao final, as placas foram novamente incubadas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ por quatro dias.

As placas foram analisadas por meio de microscópio invertido, buscando pela presença do efeito citopático padrão (ECP) para o pestivírus. As amostras que não apresentaram ECP foram consideradas reagentes. A presença ECP indica a ausência de ligação antígeno-anticorpo e a amostra, portanto, foi considerada não reagente. O título de anticorpos foi obtido pelo inverso da maior diluição no qual o efeito citopático não foi observado.

4.5.3.2 Herpesvírus bovino tipo 1

Semelhante ao teste para VDVB, placas de micro titulação com 96 cavidades de fundo chato (TPP- Techno Plastic Products AG, Switzerland) foram utilizadas com os seguintes objetivos: reação, controle de soro, controle de doses e retrotitulação.

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. 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.

Todas as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C por uma hora. Em seguida, todas as placas receberam 100µL de suspensão de células MDBK na concentração de 3×10^5 células/mL, em cada cavidade. As placas foram analisadas por meio de microscópio invertido, após quatro dias de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Buscou-se pela presença do efeito citopático padrão (ECP) para o herpesvírus. As amostras que não apresentaram ECP foram consideradas reagentes. A presença ECP indica a ausência de ligação antígeno-anticorpo e a amostra, portanto, foi considerada não reagente. O título de anticorpos foi obtido pelo inverso da maior diluição no qual o efeito citopático não foi observado.

O teste foi validado por meio 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).

4.5.3.3 Vírus respiratório sincicial bovino

Para a reação de soro-neutralização, placas de micro titulação com 96 cavidades de fundo chato (TPP- Techno Plastic Products AG, Switzerland) foram utilizadas com os seguintes objetivos: reação, controle de soro, controle de doses e retitulação. 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. 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 à 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. As placas foram analisadas por meio de microscópio invertido, após quatro dias de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Buscou-se pela presença do efeito citopático padrão (ECP) para esta estirpe. As amostras que não apresentaram ECP foram consideradas reagentes. A presença ECP indica a ausência de ligação antígeno-anticorpo e a amostra, portanto, foi considerada não reagente. O título de anticorpos foi obtido pelo inverso da maior diluição no qual o efeito citopático não foi observado.

O teste foi validado por meio 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).

4.5.3.4 Real-Time PCR para detecção de Parainfluenza bovina tipo- 3 e Influenza vírus D

O RNA viral foi extraído a partir das amostras de lavado traqueobrônquico utilizando o método *MagMAXTM Viral RNA Isolation* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Inicialmente, preparou-se um mix de reagentes constituído por 10µL de RNA Binding Beads, 10µL Lysis/Binding Enhancer e 130µL de Lysis/Binding Solution. Em seguida, os reagentes foram distribuídos em 6 placas na seguinte ordem: placa 1 - 150µL do mix preparado; placa 2- 150µL wash solution 1; placa 3- 150µL wash solution 1; placa 4- 150µL wash solution 2; placa 5- 150µL wash solution 2; placa6 - 75µL de Elution buffer.

As detecções moleculares de Plb-3 e IVD foram realizadas por meio do One Step Real Time PCR. Para o Plb-3, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores e sonda desenhados especificamente para os genótipos (HORWOOD; GRAVEL; MAHONY, 2008), assim como descrito por Horwood e Mahony (2011) (Tabela 6). Para a pesquisa de IVD, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Ferguson et al. (2015) (Quadro 6).

Quadro 6 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores sonda para detecção de Parainfluenza Bovino tipo -3 e Influenza vírus D

Iniciadores	Sequências
BPI3F*	TGTCTCCACTAGATAGAGGGATAAAATT
BPI3R*	GACATGATAACAATGCCATGGA
BPI3P*	VICACAGCAATTGGATCAATAA-MGB-NFQ
PB1F**	5'-GGC ATAAGCAGAGGATTTTAT-3'
PB1R**	5'-AGCAGTAGCAAGAGGATTTTCTGTTA T-3'
FAM-probe**	5'-TTCAGGCAAGCAGCCCGTAGGATT-3'

Fonte: *HORWOOD; MAHONY (2011); ** FERGUSON et al., (2015).

A reação foi elaborada para volume final de 15 µL, constituída por: 3,5 µL de tampão para PCR; 0,25 µL Enzima (25X RT-PCR Enzyme - Ambion); 1,0 µL de sonda; 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol), 5,25 µL de água deionizada estéril e 5µL de RNA. O ciclo de amplificação utilizado para ambos foi aquele estabelecido por Horwood e Mahony (2011) e é descrito por: 1 ciclo por 15 segundos a 45°C; 45 ciclos a 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva dos resultados foi determinada pelas frequências relativas e absolutas. A comparação entre as proporções encontradas nos achados microbiológicos e sorológicos e o status de saúde e as manifestações clínicas apresentadas pelos bezerros, foram realizada por meio do teste Qui-Quadrado de Pearson, ou Teste Exato de Fisher quando da presença de variáveis com valores menores que cinco. Fez-se a determinação da ODDS RATIO, ou seja, razão de chances, o qual é apresentado a chance de um indivíduo exposto possuir a condição em estudo quando comparada ao indivíduo não exposto (FRANCISCO et al., 2008). As variáveis com nível de significância menores ou iguais a 10% nessas primeiras análises foram selecionadas e aplicadas no teste de regressão logística multivariada, a fim de determinar a real importância dessas variáveis no estudo. Para tal, utilizou-se o método *Backward Conditional* de seleção, no qual todas as variáveis são incorporadas ao mesmo tempo e depois, por etapas, cada uma pode ser ou não eliminada. Todas as análises bem como a montagem do banco de dados

foram realizadas com o auxílio do *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 16.0.

4 RESULTADOS

Com os dados obtidos pelo exame físico, os animais foram classificados em dois grupos: sem broncopneumonia (sadios) e com broncopneumonia (doentes), baseando-se nos critérios utilizados por Benesi et al. (2013) modificado, no qual os animais deveriam apresentar pelo menos dois dos seguintes parâmetros: secreção nasal muco purulenta ou purulenta, tosse, reflexo de tosse positivo, auscultação pulmonar apresentando crepitação, ronco, frequência respiratória acima de 36 movimentos respiratórios por minuto e temperatura retal acima de 39,5°C.

Devido a falta de dados relacionados às manifestações clínicas utilizadas na classificação dos animais em algumas fichas clínicas, somente 141 animais puderam ser corretamente classificados e utilizados nas análises. Neste contexto, 57,45% (81/141) animais pertenceram ao grupo dos sadios e 42,55% (60/141) animais ao grupo dos animais com broncopneumonia (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos animais sadios e doentes estudados nos assentamentos das regiões de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Municípios	Sadios N(%)	Doentes N(%)	Total N(%)
Caiuá	08 (10)	14 (23)	22 (16)
M. de Paranapanema	32 (40)	12 (20)	44 (31)
Presidente Epitácio	41 (50)	34 (57)	75 (53)
Total	81 (100)	60 (100)	141 (100)

Fonte: (Gaeta, N.C., 2016)

5.1 BACTÉRIAS AERÓBIAS

Após o crescimento bacteriano por 48h em estufa, obteve-se 176 isolados bacterianos, sendo 77% (135/176) Gram-positivas e 23% (41/176) Gram-negativas. Em relação ao total de animais, observou-se maior frequência de isolamento de

Bacillus sp., *Staphylococcus intermedius* e bactérias Gram-negativas não fermentadoras (56%, 32% e 9%, respectivamente) (Tabela 3). Colônias fúngicas e ausência de crescimento foram observadas em 6% dos achados. Não houve o isolamento de *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica*

Tanto no grupo sadio quanto o doente foram isolados *Bacillus* sp. e *Staphylococcus intermedius* numericamente semelhantes, sendo no primeiro grupo de 58% e 31%, respectivamente e no segundo grupo de 53% e 35%, respectivamente. Bactérias Gram-negativas não fermentadoras foram identificadas em 10% dos animais do grupo sadio e 8% do grupo doente. Finalmente, como a quarta espécie mais prevalente detectada, ressalta-se a presença de *Pantoea agglomerans* em 5% dos animais do grupo sadio e 10% do grupo doente (Tabela 3). O crescimento de colônias fúngicas foi observado em 9% das amostras do grupo um e em 2% no grupo dois.

Tabela 3 - Frequência de observação de bactérias aeróbias em amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros sadios e doentes criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo - 2016

Bactérias aeróbias	Animais sadios	Animais doentes	Total
	Positivo/total(%)	Positivo/total(%)	Positivo/total(%)
<i>Bacillus</i> sp	47/81 (58,00)	32/60 (53,00)	79/141 (56,00)
<i>S. intermedius</i>	25/81 (31,00)	21/60 (35,00)	46/141 (32,00)
GNNF	08/81 (10,00)	05/60 (08,00)	13/141 (09,00)
<i>P. agglomerans</i>	04/81 (05,00)	06/60 (10,00)	10/141 (07,00)
<i>Streptococcus</i> sp.	05/81 (06,00)	04/60 (07,00)	09/141 (06,00)
Enterobactérias	01/81 (01,00)	04/60 (07,00)	05/141 (03,50)
<i>Escherichia coli</i>	02/81 (02,50)	02/60 (03,00)	04/141 (03,00)
<i>S. aureus</i>	02/81 (02,50)	-- (--)	02/141 (01,50)
<i>S. rubidae</i>	02/81 (02,50)	-- (--)	02/141 (01,50)
<i>E. cloacae</i>	01/81 (01,00)	01/60 (02,00)	02/141 (01,50)
<i>Proteus</i> sp.	-- (--)	01/60 (02,00)	01/141 (00,07)
<i>Pseudomonas</i> sp.	-- (--)	01/60 (02,00)	01/141 (00,07)
<i>E. aerogenes</i>	01/81 (01,00)	-- (--)	01/141 (00,07)
<i>S. maltophilia</i>	01/81 (01,00)	-- (--)	01/141 (00,07)

Fonte: (GAETA, N. C., 2016)

Nota: Abreviação utilizada: GNNF Gram negativas não fermentadoras; -- (--): isolamento negativo

Setenta e duas amostras apresentaram colônias puras de oito das 14 espécies identificadas. *Bacillus* sp. foi a espécie mais prevalente dentre as colônias puras encontradas em relação a todos os animais (30,49%), seguida por *S. intermedius* (6,38%), *P. agglomerans* (4,96%) e Gram-negativas não fermentadoras (4,25%) (Tabela 2). O grupo dos sadios apresentou a maior ocorrência de colônias puras (44/81), com destaque para as espécies mencionadas anteriormente. *Proteus*

sp., *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, *E. aerogenes* e enterobactérias foram identificadas somente nos animais sadios. *Serratia rubidae* e *S. maltophilia*, no entanto, foram detectadas somente no grupo dos doentes (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência de observação de colônias puras em amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros sadios e doentes criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo – 2016

Espécies	Sadios	Doentes	Total
	Positivo/total (%)	Positivo/total (%)	Positivo/total (%)
<i>Bacillus sp.</i>	28/81 (34,57)	15/60 (25,00)	43/141 (30,49)
<i>S. intermedius</i>	06/81 (07,40)	03/60 (05,00)	09/141 (06,38)
<i>P. agglomerans</i>	03/81 (03,70)	04/60 (06,67)	07/141 (04,96)
GNNF	04/81 (04,94)	02/60 (03,33)	06/141 (04,25)
<i>Streptococcus sp.</i>	01/81 (01,23)	02/60 (03,33)	03/141 (02,12)
<i>Serratia rubidae</i>	01/81 (01,23)	-- (--)	01/141 (00,71)
<i>Proteus sp.</i>	-- (--)	01/60 (01,67)	01/141 (00,71)
<i>Pseudomonas sp.</i>	-- (--)	01/60 (01,67)	01/141 (00,71)
<i>E. coli</i>	-- (--)	01/60 (01,67)	01/141 (00,71)
<i>E. aerogenes</i>	-- (--)	01/60 (01,67)	01/141 (00,71)
<i>S. maltophilia</i>	01/81 (01,23)	-- (--)	01/141 (00,71)
Enterobactéria	-- (--)	02/60 (03,33)	02/141 (01,42)
TOTAL	44/81 (54,32)	32/60 (53,34)	76/141 (53,90)

Fonte: (Gaeta, N. C., 2016)

Nota: Abreviação utilizada: GNNF Gram negativas não fermentadoras; -- (--): isolamento negativo

5.2 MICOPLASMAS

Colônias foram isoladas em 7,0% (10/141) das amostras. Os cultivos positivos apresentaram diminuição do pH, com mudança da coloração do alaranjado para o amarelo, ausência de turbidez e colônias com aspecto de “ovo frito” (Figura 5).

Figura 6 - Colônias de micoplasma isoladas de amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros

Fonte: (GAETA, N. C., 2016)

Todas as colônias foram determinadas como integrantes da classe *Mollicutes*. Após PCR espécie-específica, observou-se, numericamente, maior frequência de colônias cuja espécie de bactéria da classe *Mollicutes* não fora determinada com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Tabela 5).

Tabela 5 - Isolamento e identificação de bactérias da classe *Mollicutes* em colônias isoladas de amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo - 2016

Espécies	Sadios	Doentes	Total
	Positivo/total (%)	Positivo/total (%)	Positivo/total (%)
<i>M. dispar</i>	01/81 (01,23)	01/60 (01,67)	02/141 (01,42)
<i>M. bovis</i>	-- (--)	-- (--)	-- (--)
<i>M. m. subsp. mycoides</i> SC	-- (--)	-- (--)	-- (--)
Não determinada	05/81 (06,17)	03/60 (05,0)	08/141 (05,67)
Total	06/81 (07,40)	04/60 (06,67)	10/141 (07,09)

Fonte: (Gaeta, N.C., 2016)

-- (--): isolamento negativo

O PCR “genérico” também foi realizado para detectar a presença dessas bactérias diretamente nas amostras de lavado traqueobrônquico (Tabela 6). Foram detectadas 29 amostras positivas (20,57%) para a classe *Mollicutes*, das quais 18,5% também não puderam ter a espécie detectada com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Tabela 6 - Detecção de bactérias da classe *Mollicutes* e suas espécies por reação da cadeia da polimerase em amostras de lavado traqueobrônquico de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Espécies	Sadios	Doentes	Total
	N(%)	N(%)	N(%)
Indeterminada	14/81 (17,30)	12/60 (20,00)	26/141 (18,44)
<i>M. dispar</i>	02/81 (02,50)	01/60 (01,67)	03/141 (02,13)
<i>M. m. subsp. mycoides</i> SC	-- (--)	-- (--)	-- (--)
<i>M. bovis</i>	-- (--)	-- (--)	--(--)
Total	16/81 (17,80)	13/60 (21,67)	29/141 (20,57)

Fonte: (GAETA, N. C., 2016)

-- (--): negativo

5.3 VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO PARA VDVB, HVBo-1 E VRSB

A soro-neutralização para VDVB foi realizada somente com 122 amostras, das quais 24,59% (30/122) foram reagentes, sendo que o grupo de animais doentes apresentou, numericamente, maior frequência de animais positivos (29,63%) quando comparado aos animais sadios (20,59%) (Tabela 4). A frequência de reagentes para anticorpos contra HVBo-1 e contra VRSB foi semelhante no grupo de animais sadios (31,88% e 33,87%, respectivamente). Comparando com os demais, os anticorpos contra VRSB foram, numericamente, os mais prevalentes no grupo de animais doentes (44,44%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição de animais reagentes e não reagentes ao teste de vírus-neutralização para VRSB, HVBo-1 e VDVB em amostras de soro de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Vírus	Sadios		Doentes		Total
	R Positivo/total (%)	NR Positivo/total (%)	R Positivo/total (%)	NR Positivo/total (%)	
VRSB	21/62 (33,87)	41/62 (66,13)	24/54 (44,44)	30/54 (55,55)	45/116 (38,79)
HVBo-1	22/69 (31,88)	47/69 (68,11)	17/54 (31,48)	37/54 (68,52)	39/123 (31,71)
VDVB	14/68 (20,59)	54/68 (79,41)	16/54 (29,63)	38/54 (70,37)	30/122 (24,59)

Fonte: (GAETA, N. C., 2016)

R: reagente; NR: não reagente

É possível observar que numericamente, os rebanhos localizados nos municípios de Caiuá e Presidente Epitácio apresentam maior prevalência de anticorpos contra VRSB (Tabela 8). Já àquelas localizadas em Mirante de Paranapanema apresentaram maior prevalência de anticorpos contra HVBo-1.

Tabela 8 - Prevalência de anticorpos contra VDVB, HVBo-1 e VRSB após vírus-neutralização em amostras de soro de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Município	HVBo-1	VRSB	VDVB
	Positivo/Total (%)	Positivo/Total (%)	Positivo/Total (%)
Caiuá	03/06 (50,00)	04/06 (66,67)	03/06 (50,00)
Presidente Epitácio	06/13 (46,15)	08/13 (61,54)	05/12 (41,67)
M. de Paranapanema	11/19 (57,89)	10/20 (50,00)	09/20 (45,00)

Fonte: (GAETA, N.C., 2016)

De maneira geral, anticorpos contra dois ou três vírus foram observados em 29 animais estudados, sendo a presença de anticorpos contra HVBo-1 e contra VRSB a mais prevalente (Tabela 9). No grupo dos doentes, anticorpos contra VDVB e VRSB foram os mais frequentes, diferindo do grupo dos animais sadios, no qual a presença simultânea de anticorpos contra HVBo-1 e VRSB foi a mais observada. Notou-se, ainda, a presença de anticorpos contra os três vírus estudados em cinco animais, sobretudo no grupo dos animais sadios.

Tabela 9 - Frequência simultânea de anticorpos contra os principais vírus relacionados às pneumonias bovinas, de acordo com o status de saúde de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Anticorpos	Sadios	Doentes	Total
	Positivo/Total (%)	Positivo/Total (%)	Positivo/Total (%)
HVBo-1+VRSB	06/62 (09,67)	04/54 (07,41)	10/116 (08,62)
BVD+VRSB	01/62 (01,61)	08/54 (14,81)	09/116 (07,76)
VDVB+HVBo-1	02/62 (03,22)	03/54 (05,55)	05/116 (04,31)
VDVB+HVBo-1+VRSB	04/62 (06,45)	01/54 (01,55)	05/116 (04,31)
Total	13/62 (20,97)	16/54 (29,63)	29/116 (25,00)

Fonte: Gaeta, N. C. (2016)

A predominância de animais apresentando título de anticorpos contra VDVB e VRSB entre 0,3-0,9, com predomínio do segundo grupo foi observada. O intervalo mínimo de título de anticorpos contra VDVB, no entanto, foi de 1,0-1,3, com a maioria dos reagentes para esta imunoglobulina apresentando valores dentro deste intervalo. Os maiores títulos obtidos (2,8-3,7) foram notados somente no grupo dos doentes com anticorpos contra VDVB (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Frequência de título de anticorpos contra HVBo-1, VDVB e VRSB determinada pela reação de vírus-neutralização em soro de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante de Paranapanema e Presidente Epitácio, segundo status de saúde - São Paulo - 2016

Fonte: (GAETA, N.C., 2016)

5.4 DETECÇÃO DE PARAINFLUENZA BOVINO TIPO-3 E INFLUENZA VÍRUS D POR RT-PCR

Devido a falta de quantidade de reagente necessária para a reação, a pesquisa pelo vírus Parainfluenza bovina tipo-3 e o Influenza vírus D por meio de Real-Time PCR foi realizada em 70 amostras, sendo 39 bezerros sadios e 31 bezerros com broncopneumonia. Não houve detecção destes vírus em nenhuma das amostras analisadas.

5.5 RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

5.5.1 Micro-organismos e pneumonia

Não foi observada associação entre as bactérias aeróbias isoladas bem como àquelas da Classe *Mollicutes* e o status de saúde dos animais, ao nível de significância de 10%. Nenhum destes micro-organismos foi caracterizado como

possíveis fatores de risco para a ocorrência de broncopneumonia nos bezerros dos assentamentos estudados (Tabela 10).

Tabela 10 - Associação entre as bactérias aeróbias, *Mollicutes* e *M. dispar* e o status de saúde de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Bactérias aeróbias	Sadios	doentes	Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
<i>Proteus sp.</i>	-- (--)	01	n.c.	0,247
<i>Pseudomonas sp.</i>	-- (--)	01	n.c.	0,247
<i>S. aureus</i>	02	-- (--)	n.c.	0,216
<i>S. intermedius</i>	25	21	1,181 (0,576-2,418)	0,650
<i>Bacillus sp</i>	47	32	0,786 (0,394-1,568)	0,493
<i>Streptococcus sp.</i>	05	04	1,067 (0,273-4,161)	0,926
<i>S. rubidae</i>	02	-- (--)	n.c.	0,605
<i>Escherichia coli</i>	02	02	1,339 (0,183-9,800)	0,773
GNNF	08	05	0,814 (0,252-2,630)	0,730
Enterobactérias	01	04	5,630 (0,612-51,777)	0,213
<i>P. agglomerans</i>	04	06	2,106 (0,566-7,837)	0,424
<i>E. cloacae</i>	01	01	1,333 (0,082-21,773)	1,000
<i>E. aerogenes</i>	01	-- (--)	n.c.	1,000
<i>S. maltophilia</i>	01	-- (--)	n.c.	1,000
<i>Mollicutes</i>	16	13	1,124 (0,492-2,558)	0,781
<i>M. dispar</i>	02	01	0,669 (0,059-7,559)	0,744
<i>M. m. subsp. mycoides</i> SC	-- (--)	-- (--)	n.c.	n.c.

Fonte: (GAETA, N. C., 2016)

Nota: Abreviação utilizada: GNNF Gram negativas não fermentadoras; n.c. valor não calculado; -- (--)-valor nulo

Assim como as bactérias, a presença de anticorpos contra VDVB, HVBo-1 e VRSB não foi associada ao status de saúde dos animais. De forma semelhante aos outros micro-organismos avaliados, a presença de anticorpos não foi determinada como fator de risco para a pneumonia (Tabela 11).

Tabela 11 - Associação entre VDVB, VRSB e HVBo-1 e o status de saúde de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Anticorpos	Sadios	Doentes	Odds Ratio (IC)	p-valor
VDVB	14	16	1,322 (0,081-21,575)	1,000
HVBo-1	22	17	0,981 (0,483-1,995)	0,959
VRSB	21	24	1,583 (0,784-3,198)	0,199

Fonte: (Gaeta, N. C., 2016)

5.5.2 Dados da ficha clínica X micro-organismos

Não foi encontrada associação entre o status de saúde dos animais com as variáveis sexo e idade. De maneira semelhante, nenhuma associação entre os micro-organismos, bem como os anticorpos estudados com as variáveis sexo e idade foram identificadas. Entretanto, associações entre alguns sinais e sintomas e os achados microbiológicos e sorológicos foram identificadas após análise univariada (Tabela 12).

- A chance dos bezerros terem enterobactérias e apresentarem desidratação é 7,7 vezes maior do que estarem hidratados. Quando comparada a presença de desidratação leve, observou-se que a chance dos animais apresentarem enterobactérias e desidratação leve é 10,25 vezes maior que serem hidratados.
- Em relação aos mollicutes, a chance dos animais apresentarem estas bactérias e secreção nasal serosa é 2,325 vezes a chance de não apresentarem secreção.

Tabela 12 - Associação entre os dados do exame físico e os resultados microbiológicos e sorológicos de bezerros criados nos assentamentos dos municípios de Caiuá, Mirante do Paranapanema e Presidente Epitácio - São Paulo - 2016

Micro-organismo/anticorpos	Variável	OR (I.C. 95%)	p-valor
Enterobactérias	Desidratação leve	11,25 (1,703-74,309)	0,019
<i>Mollicutes</i>	Secreção nasal serosa	3,325 (1,192-9,274)	0,030

Fonte: (Gaeta, N. C., 2016)

5 DISCUSSÃO

O caráter multifatorial e multi – agente dos problemas respiratórios dos bovinos faz com sejam caracterizados como grande complexo (GRIFFIN et al., 2010). Somado aos quadros de diarreia, os problemas respiratórios são os principais problemas na criação de bezerros (AUTIO et al., 2007) e podem ocorrer como

infecções inaparentes, agudas ou crônicas, dependendo do micro-organismo envolvido. A combinação dos fatores ambientais e de manejo predispõe os animais a pneumonia (TAYLOR et al., 2010). As infecções virais, da mesma maneira, são frequentemente descritas como importantes fatores predisponentes às infecções bacterianas, devido às mudanças no ambiente respiratório e as interações entre esses micro-organismos (BOSCH et al., 2013). Embora as infecções virais possam ocorrer na ausência de co-infecção bacteriana (DECARO et al., 2010), são comumente descritas como infecções que antecedem ou que ocorrem concomitantemente com as infecções bacterianas (HÄRTEL et al., 2004; AUTIO et al., 2007b).

No presente trabalho, 14 diferentes grupos de bactérias aeróbias foram identificados, sendo que *Bacillus* spp., *Staphylococcus intermedius* e bactérias Gram-negativas não fermentadoras foram os micro-organismos mais prevalentes nas amostras estudadas. Nenhuma associação entre as espécies detectadas e o status de saúde dos animais foi constatada. Os resultados concordam com o trabalho conduzido por Benesi et al. (2013), no qual observou *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias como os micro-organismos predominantes no sistema respiratório dos bezerros. Enterobactérias também foram detectadas no trabalho realizado por Barros et al. (1994). Estudando o trato respiratório superior (TRS) de bezerros e outros animais de produção, Garg e Sharma (1979) identificaram *E. coli*, *Serratia rubidae* e *Enterobacter* spp.. Por outro lado, estudando o trato respiratório inferior (TRI) de bovinos, Elshafee (2003) avaliou 50 pulmões de animais com pneumonia abatidos no Sudão, dos quais, 34 apresentaram crescimento bacteriano, com identificação de *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp. Estudando amostras de lavado traqueobrônquico de bovinos em propriedades paulistas, De Oliveira et al. (2016) detectou principalmente *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. Avaliando amostras de ambos TRS e TRI, Asaye, Biyazen e Bezie (2015) isolaram *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp, concordando com os resultados do presente trabalho. As enterobactérias, ainda, foram associadas a desidratação leve. Sabe-se que muitas das espécies deste grupo são responsáveis por quadros de diarreia (ADEN et al., 1969; GUINÉE et al., 1981; RIBEIRO et al., 2000), levando a desidratação. Sabe-se, ainda, que a diarreia é a principal causa de

morbidade e mortalidade em bezerros, seguida pelas pneumonias. Neste caso, a associação encontrada pode não estar relacionada ao quadro de pneumonia, mas, o estresse provocado por esta afecção pode ter sido um fator predisponente para a instalação do quadro de pneumonia.

Muitas das espécies relatadas anteriormente estão presentes no meio ambiente, podendo ser inaladas pelos animais e, portanto, serem detectadas durante o diagnóstico, seja no TRS quanto TRI, como demonstrado pelos resultados descritos acima. Embora muitos trabalhos não caracterizem estas bactérias como importantes agentes relacionados às pneumonias (LONERAGAN et al., 2001b; GRIFFIN, 2010; GRIFFIN et al., 2010), sua presença não deve ser negligenciada, dada a característica oportunista destas espécies. Sabe-se que, em situações particulares, espécies que não são descritas como patógenos responsáveis por pneumonias em humanos são capazes de desenvolverem esse quadro. Dentre os *Bacillus* spp., *B. cereus* já foi associado a infecções respiratórias em adultos e neonatos devido a circuitos de ventilação contaminados (MILLER et al., 1997). *S. intermedius*, por sua vez, são considerados agentes zoonóticos, existindo relatos de otite média em humanos, com transmissão do agente por cães (TANNER; EVERETT; YOUNG, 2000). São espécies frequentemente isoladas em pele de cães com piодermite (PELLERIN et al., 1998; GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004) e leite de vacas com mastite (ROBERSON et al., 1996; PELLERIN et al., 1998). O único caso de pneumonia associada a esta espécie foi descrita em humanos por Gerstadt et al. (1999), após procedimento de revascularização (“coronary artery bypass grafting”). Embora alguns trabalhos tenham descrito a presença de *Staphylococcus* sp. no TRI de bovinos, ao nosso conhecimento este é o primeiro relato de *Staphylococcus intermedius* nesta região.

O terceiro grupo mais prevalente detectado no presente trabalho foi o das bactérias Gram-negativas não fermentadoras. Dentre as muitas espécies que compõe este grupo, destaca-se *Moraxella catarrhalis*, diplococo aeróbio considerado como parte da microbiota normal do trato respiratório superior e inferior dos seres humanos (ARIZA-PROTA et al., 2016). Atualmente é apontada como a terceira mais importante bactéria associada a quadros de pneumonia nesta espécie, principalmente entre os idosos (JOHNSON; DREW; ROBERTS, 1981; ARIZA-PROTA et al., 2016) e crianças (SY; ROBINSON, 2010; HONKINEN et al., 2012).

Utilizando sequenciamento de nova geração, Holman, Timsit e Alexander (2015) detectaram o gênero *Moraxella* em 9,4% das amostras de TRS de bovinos. Embora seja descrita como patógeno exclusivo de seres humanos (GOLDSTEIN; MURPHY; PARAMESWARAN, 2009), *M. catarrhalis* já foi isolada a partir de pulmões de bezerros com pneumonia e sua presença confirmada nas lesões pulmonares dos mesmos bezerros por meio de imunohistologia (NAGAI et al., 1995). *Moraxella* spp. foi isolada a partir de aspirado trans-traqueal de bezerros doentes e sadios no estudo conduzido por Angen et al., (2009a). Desta maneira, ainda que não tenha sido confirmada a existência desta espécie nas amostras do presente trabalho, a detecção do grupo de bactérias a qual pertence nos alerta para a possível presença deste micro-organismo nos animais do presente estudo, já que não há relatos de seu isolamento e/ou identificação nos rebanhos brasileiros.

Embora *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* sejam reconhecidas como os principais micro-organismos associados aos quadros de pneumonias em bovinos (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; DABO; TAYLOR; CONFER, 2007; GRIFFIN, 2010; GRIFFIN et al., 2010), essas espécies não foram detectadas no presente trabalho. Nossos resultados concordam com aqueles obtidos por Benesi et al. (2013) os quais também não detectaram a presença destas bactérias. Por outro lado, esses micro-organismos se sobressaem em muitas pesquisas que avaliam animais com pneumonia. Ambas as espécies foram encontradas nos estudos conduzidos por Härtel et al. (2004) e por Autio et al. (2007a), nos quais o lavado traqueobrônquico também foi a amostra de escolha. Em um trabalho realizado no Estado de São Paulo, De Oliveira et al. (2016) detectou *P. multocida* em 16% (11/68) das amostras de lavado traqueobrônquico. Ressalta-se que no segundo estudo citado, *P. multocida* foi a espécie mais prevalente, sendo isolada em 34% das amostras e associada as doenças respiratórias. Ao investigar o aspirado trans-traqueal de bezerros sadios e doentes, Angen et al. (2009) detectou *P. multocida* e *M. haemolytica* em ambos os grupos, com destaque para a primeira, mais prevalente nos animais doentes (82%) que nos sadios (48%). Estas espécies também foram encontradas no TRS de bovinos. Seker, Kuyucuoglu e Konak (2009) detectaram tanto em animais doentes como em sadios, sendo que nos primeiros, *M. haemolytica* foi detectada em 100% dos animais.

Como citado anteriormente, não houve isolamento dessas espécies durante o desenvolvimento do presente trabalho. Acredita-se que a alta concentração de bactérias como *Bacillus* spp. pode ter inibido o crescimento de *P. multocida* e *M. haemolytica*, seja através da competição pelos nutrientes contidos no meio de cultura, seja pela produção de substâncias com propriedades antimicrobianas que impeçam o crescimento de algumas espécies, caracterizando a interação negativa do tipo amensalismo. Corroborando com nossa hipótese, Corbeil et al. (1985) estudaram a capacidade de micro-organismos pertencentes a microbiota respiratória favorecerem ou inibirem o crescimento de *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni* *in vitro*. Os pesquisadores verificaram que *Bacillus* spp. foram os responsáveis pelo maior número de inibições de crescimento dentre as espécies estudadas. Sabe-se que algumas das espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produzir peptídeos antimicrobianos que inibem o crescimento de determinadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CHERIF et al., 2001; SHELBURNE et al., 2006). A capacidade de modular o crescimento de algumas espécies levou a utilização do *B. subtilis* na formulação de probióticos (GUO et al., 2006; OPALINSKI et al., 2007). Xie et al. (2009), observaram-se que a bacteriocina produzida por um isolado de *B. subtilis* (*B. subtilis* LFB 112) foi capaz de inibir consideravelmente o crescimento de algumas espécies, dentre elas a *P. multocida*. Diante do exposto, levantou-se a seguinte hipótese em relação aos resultados obtidos no presente trabalho: a possibilidade de os resultados serem falsos negativos, sendo a interação ocorrida *in vitro*.

Cultura pura de *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *E. aerogenes* e enterobactérias foi observada somente no grupo dos animais doentes. A obtenção de culturas puras em um exame diagnóstico é fator determinante para a confirmação do agente etiológico do quadro estudado. Em relação aos resultados da presente pesquisa, sabe-se que *Pseudomonas aeruginosa* já foi relatada como responsável por pneumonias em humanos (TAKAKURA et al., 2015; MAMOUDOU et al., 2015; MICEK et al., 2015; KINOSHITA et al., 2015) e em bovinos (PRASAD et al., 1967; BARBOUR et al., 1997; COUTINHO, 2005). *E. coli*, por sua vez, embora seja responsável por casos de diarreia (GUINÉE et al., 1981), é caracterizado como causa comum de pneumonia comunitária adquirida em humanos (MARRIE et al., 1998), assim como *E. aerogenes*, embora em menor prevalência (BOYER et al., 2011). Parte do gênero *Proteus*, *Proteus mirabilis* também já fora relatado como

agente responsável por pneumonia em humanos (OKIMOTO et al., 2010). Sabendo do papel destas bactérias no desenvolvimento de pneumonia em humanos, faz-se necessário, portanto, mais estudos para determinar sua importância na pneumonia dos bovinos.

Bactérias da Classe *Mollicutes* foram isoladas em 7% (10/141) das amostras, com maior frequência nos animais sadios. A taxa de isolamento obtido foi menor daquela obtida por De Oliveira et al. (2016), o qual isolou essas bactérias em 25% (12/96) das amostras de lavado traqueobrônquico. Já a detecção de *Mollicutes* diretamente no lavado resultou na identificação de 20,5% de positivos, principalmente no grupo dos sadios. Esse resultado discorda do encontrado por De Oliveira et al. (2016), o qual observou 70,83% de positivos, embora também tenha constatado maior frequência nos animais sem broncopneumonia. Ao avaliar o TRS de bovinos sadios e doentes, Marques et al. (2007) detectaram alta frequência dessas bactérias (72,1%), principalmente no grupo dos doentes (90,9%), embora também tenha sido observada alta prevalência no grupo de animais sadios (52,0%). Diante do exposto, os achados em ambos os grupos reafirmam a hipótese de que os *Mollicutes* fazem parte da microbiota do sistema respiratório dos bovinos e que, após mudanças na mucosa e em todo ambiente respiratório, se tornariam patogênicos levando aos problemas respiratórios. Além disso, sabe-se que a infecção inicial ocorre no TRS, com posterior disseminação para o TRI (HODGE; SIMECKA, 2002), de modo que o estudo de ambos seja imprescindível na tentativa de melhor entender o papel dessas bactérias na patogênese das doenças respiratórias. A classe *Mollicutes* foi associada a variável “secreção nasal serosa”. De Oliveira et al. (2016), no entanto, observou associação entre esta classe e a presença de alteração na percussão pulmonar. Maeda et al. (2003) estudaram a pneumonia por *M. bovis* e verificaram, dentre outros sinais e sintomas, a presença de secreção nasal, embora os autores não tenham caracterizado o exsudato.

A utilização de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de *M. dispar*, *M. bovis* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC nas colônias bem como nas amostras resultou somente na identificação da primeira espécie, em frequência semelhante nos grupos sadio e doente. De Oliveira et al. (2016), observou maior frequência de *M. dispar* nas amostras de lavado traqueobrônquico, com predominância no grupo dos sadios. Autio et al. (2007) identificou alta ocorrência de *M. dispar* tanto em

animais sadios (40,4%) quanto doentes (45,3%). Já Marques et al. (2007) e Angen et al. (2009), embora tenham detectado esta espécie em ambos os grupos, observaram predominância no grupo dos doentes. Com o objetivo de determinar a prevalência de *M. díspar* no TRS de bovinos, Šiugždaitė, Gabinaitienė e Šiugžda (2015) observaram 17,9% de positivos no grupo de animais sadios e 83,3% no grupo de animais com problemas respiratórios. Em um estudo retrospectivo conduzido no Reino Unido, Ayling, Bashiruddin e Nicholas (2004) verificaram que *M. díspar* já fora detectado em pulmões de bovinos com pneumonia. Diante do exposto, observa-se o constante aumento na ocorrência desta espécie tanto em animais sadios quanto naqueles com problemas respiratórios, sugerindo-se, então, que não só o *M. bovis* deve ser indicado como potencial espécie de micoplasma relacionado ao complexo respiratório bovino.

Embora *M. bovis* esteja entre as quatro espécies mais relacionadas aos problemas respiratórios nos bovinos (GRIFFIN, 2010; GRIFFIN et al., 2010), esta espécie não foi identificada nas amostras do presente trabalho, assim como nos estudos realizados por Nikunen et al. (2007) e Angen et al. (2009). Já De Oliveira et al. (2016), detectou 3% de amostras positivas, com mesma frequência nos grupos sadio e doente. Estudando pulmões de bezerros com pneumonia na Finlândia, Tegtmeier et al. (1999) isolou *M. bovis* em somente um caso de broncopneumonia supurativa. No trabalho conduzido por Ayling, Bashiruddin e Nicholas (2004), *M. bovis* foi a espécie mais identificada, especialmente em pulmões de bovinos com problema respiratório, embora também tenha sido detectado em casos de mastite e artrite. Marques et al. (2007), por sua vez, identificaram esta bactéria somente no grupo dos doentes, totalizando 6,3% das amostras. Szeredi, Jánosi e Pálfi (2010) estudaram pulmões de bezerros diagnosticados com pneumonia e detectaram alta frequência de *M. bovis* nas amostras (12/40; 30%).

Não existam relatos de isolamento e/ou identificação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC em bovinos no Brasil. Em âmbito internacional, o país não possui status oficial quanto a presença desta espécie, de acordo com a OIE. Oficialmente, Estados Unidos, Canadá, Argentina, Austrália, África do Sul, Índia, China, Portugal, Suíça, França e Singapura são os países livres da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (CBPP) (OIE, 2015). Assim como nos trabalhos nacionais realizados por Marques et al. (2007) e De Oliveira et al. (2016), esta bactéria também não foi

detectada durante a presente pesquisa. É curioso notar que embora esta espécie não tenha sido identificada em bovinos, sua presença foi detectada em amostras de conduto auditivo de caprinos saudáveis no estado do Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 2000; PEREIRA et al., 2003). Por consequência, a vigilância deve ser redobrada nas propriedades, principalmente naquelas em que há produção consorciada com caprinos e bovinos, para que não haja a transmissão deste agente para o rebanho bovino e leve aos problemas decorrentes da CBPP.

A maioria das colônias isoladas e das amostras não tiveram as espécies determinadas com os três oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Embora *M. díspar*, *M. bovis* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC sejam comumente relacionadas aos quadros de pneumonias, outras espécies dentro da classe *Mollicutes* são pesquisadas em alguns trabalhos e podem ser parte do complexo respiratório bovino. Marques et al. (2007) detectaram *Ureaplasma diversum* em 31,6% das amostras de animais com pneumonia e 8,2% em animais doentes. A associação entre *U. diversum* e as doenças respiratórias foi encontrada no estudo desenvolvido por Autio et al. (2007). Angen et al. (2009) detectaram *Mycoplasma bovirhinis* em 79% dos animais com pneumonia e em 14% dos animais sadios. Além desta mesma espécie, *Acholeplasma* sp. foi detectado em amostra de swab nasal no estudo de Zinka e Maid (2012). Da mesma forma que no presente estudo, a maioria dos isolados obtidos no estudo de Zinka e Maid (2012) não tiveram as espécies determinadas. *M. alkalescens* e *M. arginini* foram detectados somente no lavado bronco-alveolar de animais com pneumonia no estudo realizado por Thomas et al. (2002), na Bélgica. A classe *Mollicutes* apresenta cinco ordens, cada uma subdividida em famílias e gêneros. Portanto, determinar com precisão a presença de todas as espécies presente nas amostras clínicas é uma tarefa quase impossível, dado a grande quantidade de micro-organismos presentes nesta classe.

A composição da microbiota do sistema respiratório pode ser influenciada por vários fatores, podendo estar relacionado a fatores intrínsecos do hospedeiro, tais como idade, genética e higiene; fatores ambientais, como sazonalidade, tipo de produção e manejo e as interações entre os micro-organismos (BOSCH et al., 2013). Mudanças nos padrões de interação e no ambiente respiratório devido ao aumento na concentração de uma espécie, situações de estresse (como transporte, desmame) e as interações bactéria - vírus, são determinantes para o

desenvolvimento dos problemas respiratórios (BOSCH et al., 2013a). Os principais vírus relacionados ao complexo respiratório bovino são o Vírus da Diarreia Viral Bovina (VDVB), Herpes vírus tipo -1 (HVBo-1), Vírus Respiratório Sincicial Bovino (VRSB) e o Parainfluenza Bovina tipo-3 (PIb-3), sendo a importância do Influenza vírus D (IVD), ainda questionada.

O presente estudo detectou prevalência de 31,71% de anticorpos contra HVBo-1 nos bezerros estudados, sendo 22/69 (31,88%) em animais sadios e 17/54 (31,48%) em animais doentes. Esses resultados são semelhantes àqueles descritos por Poletto et al. (2004), o qual detectou 32,4% de positividade em bovinos adultos no estado do Rio Grande do Sul. Recentemente, frequências menores foram encontradas no mesmo estado por Becker et al. (2015), os quais detectaram 26,4% em 2013 e 21,7% em 2014. Muitos são os estudos que detectaram alta ocorrência ou prevalência desses anticorpos no Brasil. Na região nordeste, Silva et al. (2015) observaram prevalência de 79,5% em Pernambuco. Estudando animais submetidos a um sistema semi-intensivo de produção leiteira no Maranhão, Sousa et al. (2013), observaram anticorpos contra o vírus em 67,5% de animais. Na região Centro-Sul, De Oliveira et al. (2016), estudou animais de propriedades mais tecnificadas no estado de São Paulo, e observou 61,4% (35/57) de animais reagentes. Todos os trabalhos anteriormente citados utilizaram a vírus-neutralização como técnica diagnóstica. Utilizando a técnica de ELISA indireto, Santos et al. (2014) detectaram 66,75% de positividade no Espírito Santo. A alta frequência de animais que apresentam anticorpos contra HVBo-1 no Brasil, pode estar relacionada, dentre outros fatores, a capacidade do vírus em se manter latente nos gânglios nervosos, permitindo a eliminação viral recorrente e a manutenção da infecção dentro dos rebanhos (MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000). Assim como no Brasil, fora do país a ocorrência de anticorpos contra HVBo-1 é variável (BOELAERT et al., 2000; RAAPERI et al., 2010; SZEREDI; JÁNOSI; PÁLFI, 2010; RAAPERI; ORRO; VILTROP, 2014).

A prevalência de anticorpos contra VDVB foi 24,59% no presente estudo. Os trabalhos nacionais mais recentes apresentam ocorrência/prevalência de anticorpos contra VDVB maiores que as apresentadas no presente trabalho, utilizando a vírus-neutralização. Estudando animais do estado de São Paulo e Minas Gerais, Alexandrino (2011) observaram 69,70% de animais reagentes. No Rio

Grande do Sul, 85,4% dos bovinos estudados por Piovesan et al. (2013) apresentaram anticorpos contra VDVB. No mesmo estado, Quincozes et al. (2007) detectaram 66,32% de animais positivos. Na região central do país, Brito et al. (2010b) obtiveram 64% de animais reagentes em propriedades estudadas na região de Goiás. No nordeste brasileiro, Fernandes et al. (2015) obtiveram uma das menores prevalências relatadas (39,1%). No estado de São Paulo, De Oliveira et al. (2016) observaram 55,35% de positividade, sendo 39,3% (22/56) em animais sadios e 16% (9/56) em doentes. No presente estudo, encontramos maior prevalência em doentes (29,63%) comparado aos sadios (20,59%). Já no estudo de animais da região amazônica estado do Maranhão, Chaves et al. (2010) detectaram 61,5% de positividade utilizando a técnica de ELISA. Fora do Brasil, as prevalências também são variáveis, sendo que muitos deles utilizam a técnica de ELISA. Na Bélgica, Sarrazin et al. (2013) detectaram prevalência de 32,9% entre os animais detectados, utilizando ensaio imunoenzimático. Utilizando o mesmo ensaio, Talafha et al. (2009) obtiveram 31,9% de bovinos reagentes nos rebanhos estudados na Jordânia. Solis-Calderon, Segura-Correa e Segura-Correa (2005) estimaram prevalência de 14% em Yucatán, México.

Na presente pesquisa, a prevalência de anticorpos contra VRSB foi 38,79%. Avaliando três municípios do estado de São Paulo, Affonso et al. (2011), observaram prevalências de 45,61% - 84,42% de anticorpos contra VRSB. Em dois municípios diferentes do mesmo estado, De Oliveira (2015) detectou animais reagentes em 93,10% das amostras. No sul do Brasil, Campalans e Arns (1997) detectaram 75% de animais reagentes nas 65 propriedades estudadas. A fim de estudar a participação do VRSB em casos de pneumonia em bezerros no estado de Minas Gerais, Flores et al. (2000) detectaram anticorpos em 8/41 pulmões por meio de imunofluorescência indireta. Anticorpos contra o VRSB também foram detectados em outros países. No Equador, a soroprevalência foi de 80,48%, utilizando o teste de ELISA (SAA et al., 2012). Por meio do mesmo teste, Socha e Rola (2013) observaram 61,9% de reagentes na Polônia. No estudo conduzido por Odeón et al. (2001), a prevalência de bezerros reagentes na Argentina foi 10,7%. Moore et al. (2015) estimaram, por meio de ELISA, soroprevalência de 46% em animais australianos que foram exportados para a Rússia e Oriente Médio.

No presente estudo, observamos soroprevalência de rebanho para HVBo-1 variando entre 46,15%-57,89%. No estudo conduzido no Rio Grande do Sul, a soroprevalência de rebanho foi numericamente maior (92,85%) (POLETTTO et al., 2004). Com soroprevalência igualmente alta, Barbosa et al. (2005) observaram animais reagentes em 98,2% dos rebanhos estudados. Na Belgica, Boelaert et al. (2000) detectaram animais reagentes em 67% dos rebanhos avaliados. Observamos ainda que 41,67%-50,00% de rebanhos apresentaram animais com anticorpos contra VDVB, dependendo do município estudado. A literatura destaca altas soroprevalências dentro e fora do Brasil, indicando que a disseminação do vírus ainda é alta. No estado do Rio Grande do Sul, Poletto et al. (2004) detectaram 67,85% dos rebanhos com pelo menos um animal reagente. Brito et al. (2010a) avaliaram rebanhos do estado de Goiás e observaram que 88,3% das propriedades apresentaram animais com anticorpos contra VDVB. No Equador, a soroprevalência de rebanho foi de 74% (SAA et al., 2012). A prevalência de anticorpos contra VRSB nos rebanho foi 50,00%-66,67% nos animais estudados. Affonso et al. (2011) detectaram prevalências entre 45,61% - 84,42% nos três rebanhos estudados no estado de São Paulo. Baixa prevalência ao nível de rebanho foi observada no Irã (19%), no estudo conduzido por Shakhraee, Khalili e Kazemi Nia (2009).

Discrepâncias entre os resultados sorológicos do presente estudo e naqueles encontrados na literatura podem ocorrer devido a diferenças entre as regiões estudadas, os sistemas de produção e de manejo, diferentes faixas etárias estudadas e os métodos diagnósticos utilizados (SILVA et al., 2015).

Não houve detecção de Parainfluenza bovina tipo-3 e Influenza vírus D na presente pesquisa. No Brasil, são poucos os trabalhos que avaliaram a presença do Plb-3 nos bovinos. O primeiro estudo foi realizado no Estado de São Paulo, onde houve isolamento de Plb-3 após estudo com 25 amostras de tecido pulmonar de bovinos com problemas respiratórios (CANDEIAS; SUGAY; RIBEIRO, 1971). Já no Estado do Rio Grande do Sul Plb-3 foi isolado por Gonçalves et al., (2003) a partir de amostras de secreção nasal de um animal com pneumonia. Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se objetivou detectar a presença de IVD nos rebanhos brasileiros. Fora das nossas fronteiras, já fora detectado em bovinos na Itália, (CHIAPPONI et al., 2016), França (DUCATEZ; PELLETIER; MEYER, 2015) e Estados Unidos (HAUSE et al., 2013; FERGUSON et al., 2015). No estudo

conduzido por MITRA et al. (2016 no prelo)², obteve-se uma tendência de associação entre a emergência do IVD e as doenças respiratórias bovinas.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avalia a situação epidemiológica do complexo respiratório bovino em assentamentos do estado de São Paulo e é um dos poucos dentro desta temática em todo território nacional. Salientamos que, embora haja assistência veterinária nas propriedades, a ausência de parcerias com institutos de pesquisa impede a realização de constantes monitoramentos epidemiológicos na região. Por esse motivo, nosso trabalho é imprescindível para que as medidas sanitárias sejam tomadas de maneira correta, de forma a permitir que os rebanhos aumentem a produção leiteira constantemente e permita melhor qualidade de vida para a população. Os dados microbiológicos do presente estudo demonstram a complexidade na determinação do agente etiológico responsável pelo desenvolvimento do quadro. Evidenciamos, ainda, possível importância de enterobactérias e bacilos Gram-positivos na evolução do processo. Além disso, a demonstração das associações entre os micro-organismos e algumas manifestações clínicas auxiliam o clínico na tomada de decisão no momento do diagnóstico e do tratamento.

² MITRA, N.; CERNICCHIARO, N.; TORRES, S.; LI, F.; HAUSE, B. M. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. **Journal of General Virology**, 5 maio 2016. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000492.v1>>. Acesso em: 02 ago. 2014. no prelo.

6 CONCLUSÃO

- Não houve isolamento de *P. multocida* e *M. haemolytica* a partir das amostras de lavado traqueobrônquico dos bezerros saudáveis e com broncopneumonia.
- Dentre as bactérias aeróbias isoladas, observou-se maior prevalência de *Bacillus* sp., *Staphylococcus intermedius* e bactérias Gram-negativas não fermentadoras.
- Observou-se a presença de colônias puras de *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *E. aerogenes* e Enterobactérias no grupo de animais doentes.
- *M. dispar* foi a única espécie de micoplasma identificada com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Faz-se necessário a busca por outras espécies de micoplasmas que podem estar relacionadas aos casos de broncopneumonia em bovinos.
- A prevalência de Parainfluenza bovina tipo-3 e Influenza vírus D nas 70 amostras de lavado traqueobrônquico foi zero.
- Observou-se prevalência de HVBo-1, VDVB e VRSB de 31,7%, 24,6% e 38,8%, respectivamente.
- Não houve associação entre o status de saúde dos bezerros e os achados microbiológicos e sorológicos.
- Foi observada associação entre a presença de enterobactérias e a variável “desidratação leve” ($p=0,033$) e entre *Mollicutes* e a variável “secreção nasal serosa” ($p=0,03$).
- A broncopneumonia é uma enfermidade de caráter multifatorial e multiagente. Faz-se, necessário, portanto, a associação dos achados de exames físico, microbiológicos e características do ambiente e manejo para a elucidação do agente.

REFERENCIAS

(ICTV), I. C. on T. of V. **ICTV Taxonomy History for Bovine herpesvirus 1**. DisponÃ-vel em: <www.ictvonline.org>. Acesso em: 4 out. 2015.

(ICTV) INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy**.

ACKERMANN, M.; WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Veterinary microbiology**, v. 9, n. 1, p. 53–63, 1984. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6326378>>.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–787, 2000.

AFFONSO, I. B.; GATTI, S. P.; ALEXANDRINO, B.; OLIVEIRA, M. C.; MEDEIROS, A. S. R. de; BUZINARO, M. da G.; SAMARA, S. I. Detection of antibodies against bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in dairy cattle with different prevalences of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 295, 2011. DisponÃ-vel em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4311>>.

ALEMAYEHU, G.; LETA, S.; HAILU, B. Sero-prevalence of Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) in bulls originated from Borena pastoral area of Southern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 5, p. 983–987, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11250-015-0820-9>>.

ALLAN, E. M.; PIRIE, H. M.; SELMAN, I. E.; SNODGRASS, D. R. Some characteristics of a natural infection by parainfluenza-3 virus in a group of calves. **Research in veterinary science**, v. 24, n. 3, p. 339–46, 1978. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/209507>>.

ANGEN, O.; MUTTERS, R.; CAUGANT, D. A.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Taxonomic relationships of the [Pasteurella] haemolytica complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of Mannheimia haemolytica gen. nov., comb. nov., Mannheimia granulomatis comb. nov., Mannheimia glucosida sp. nov. **International journal of systematic bacteriology**, v. 49 Pt 1, p. 67–86, 1999.

ANGEN, O.; THOMSEN, J.; LARSEN, L. E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, 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. 165–71, 28 maio 2009a. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19186010>>. Acesso em: 5 out. 2014.

ANGEN, O.; THOMSEN, J.; LARSEN, L. E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, 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. 165–71, 28 maio 2009b. DisponÃ-vel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350800610X>>. Acesso em: 20 set. 2014.

ARIZA-PROTA, M. A.; PANDO-SANDOVAL, A.; GARCÍA-CLEMENTE, M.; FOLE-VÁZQUEZ, D.; CASAN, P. Community-Acquired Moraxella catarrhalis Bacteremic Pneumonia: Two Case Reports and Review of the Literature. **Case Reports in Pulmonology**, v. 2016, p. 1–3, 2016. DisponÃ-vel em:

<<http://www.hindawi.com/journals/cripu/2016/5134969/>>.

AUTIO T, POHJANVIRTA T, HOLOPAINEN R, RIKULA U, P. J.; HUOVILAINEN A, RUSANEN H, SOVERI T, S. L. and; S, P. Etiology of respiratory disease in nonvaccinated, non-medicated calves in rearing herds. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 256–265, 2007.

AUTIO, T.; POHJANVIRTA, T.; HOLOPAINEN, R.; RIKULA, U.; PENTIKÄINEN, J.; HUOVILAINEN, A.; RUSANEN, H.; SOVERI, T.; SIHVONEN, L.; PELKONEN, S. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 256–265, 2007a.

AUTIO, T.; POHJANVIRTA, T.; HOLOPAINEN, R.; RIKULA, U.; PENTIKÄINEN, J.; HUOVILAINEN, A.; RUSANEN, H.; SOVERI, T.; SIHVONEN, L.; PELKONEN, S. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 256–265, 2007b.

AYLING, R. D.; BASHIRUDDIN, S. E.; NICHOLAS, R. A. J. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. **The Veterinary record**, v. 155, n. 14, p. 413–6, 2 out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508840>>.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 11, n. 3, p. 425–445, 1995.

BARBOSA, V. P.; NASCIMENTO, E. R. do; DANELLI, M. das G. M.; NASCIMENTO, M. da G. F. do; SANTOS, M. A. J. dos; LIGNON, G. B.; RIBEIRO, V. R. Diferenciação de tipos de Mycoplasma mycoides na etiopatogenia da micoplasmose caprina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 33–36, 2000. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2015.172>>.

BASCUNANA, C. R.; MATTSSON, J. G.; BOLSKE, G.; JOHANSSON, K. E. Characterization of the 16S rRNA genes from Mycoplasma sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 9, p. 2577–2586, 1 maio 1994. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/content/long/176/9/2577>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

BASHIRUDDIN, J. B.; SANTINI, F. G.; DE SANTIS, P.; VISAGGIO, M. C.; DI FRANCESCO, G.; D'ANGELO, A.; NICHOLAS, R. A. Detection of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides in tissues from an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia by culture, immunohistochemistry and polymerase chain reaction. **The Veterinary record**, v. 145, n. 10, p. 271–274, 1999.

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, jun. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000600002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 ago. 2014.

BENNETT, R. H.; JASPER, D. E. Nasal prevalence of Mycoplasma bovis and IHA titers in young dairy animals. **The Cornell veterinarian**, v. 67, n. 3, p. 361–373, 1977.

BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J. ; RASKIN, A.; DUFÉY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOF, P. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 3-4, p. 285–295, 2000. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587700001288>>.

BOSCH, A. A. T. M.; BIESBROEK, G.; TRZCINSKI, K.; SANDERS, E. A. M.; BOGAERT, D. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003057, 2013a. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003057>>.

BOSCH, A. A. T. M.; BIESBROEK, G.; TRZCINSKI, K.; SANDERS, E. A. M.; BOGAERT, D. **Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract** **PLoS Pathogens**, 2013b.

BOYER, A., AMADEO, B., VARGAS, F., YU, M. MAURICE-TISON, S., DUBOIS, V., BÉBÉAR, C., ROGUES, A.M., GRUSON, D. Severe community-acquired Enterobacter pneumonia: a plea for greater awareness of the concept of health-care-associated pneumonia. **BMC Infectious Diseases**. v. 11, p. 120.

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

BROOKS GEO. F, CARROLL KAREN C., BUTEL JANET S., MORSE STEPHEN A., M. T. A. . **Microbiologia médica de jawetz, melnick & adelberg**. [s.l.] McGraw-Hill, 2014.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M. C.; HOWARD, C. J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Research in veterinary science**, v. 46, n. 3, p. 307–311, 1989.

BRYSON, D. G.; ADAIR, B. M.; MCNULTY, M. S.; MCALISKEY, M.; BRADFORD, H. E. L.; ALLAN, G. M.; EVANS, R. T.; FORSTER, F. Studies on the efficacy of intranasal vaccination for the prevention of experimentally induced parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. **Vet Rec.**, v. 145, p. 33–39, 1999. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bvapublications.com/cgi/content/abstract/145/2/33>>.

C.J., H. Animal ureaplasmas: their ecological niche and role in disease. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 20, p. 954–957, 1984.

CAMPBELL, R. S. F.; THOMPSON, H.; LEIGHTON, E.; PENNY, W. Pathogenesis of bovine parainfluenza 3 virus infection in organ cultures. **Journal of Comparative Pathology**, v. 79, n. 3, p. 347–352, IN17–IN18, 353–354, 1969. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014543179&partnerID=40&md5=f8e22900f61e46f80d0bcd74c220e0ea>>.

CANDEIAS, J. A.; SUGAY, W.; RIBEIRO, L. C. Isolation of Myxovirus parainfluenza 3 from cattle in the State of São Paulo, Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 5, n. 2, p. 207–12, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4333621>>.

CARBONERO, A.; SAA, L. R.; JARA, D. V.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; ARENAS, A.; BORGE, C.; PEREA, A. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, n. 1, p. 84–88, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587711000857>>.

CASTILLO-ALCALA, F.; BATEMAN, K. G.; CAI, H. Y.; SCHOTT, C. R.; PARKER, L.; CLARK, M. E.; MCRAILD, P.; MCDOWALL, R. M.; FOSTER, R. A.; ARCHAMBAULT, M.; CASWELL, J. L. Prevalence and genotype of Mycoplasma bovis in beef cattle after arrival at a feedlot. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 12, p. 1932–1943, 2012.

CASWELL, J. L.; ARCHAMBAULT, M. Mycoplasma bovis pneumonia in cattle. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 2, p. 161–186, 2007.

CETINKAYA, B.; ONGÖR, H.; KARAHAN, M.; KALENDER, H.; LORENZON, S.; THIAUCOURT, F. Abattoir-based survey of contagious bovine pleuropneumonia in cattle in Turkey. **The Veterinary record**, v. 152, n. 9, p. 254–258, 2003.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E. de; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. de M. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região Amazônica Maranhense, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1448–1451, jun. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000600035&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

CHÁVEZ GONZÁLEZ, Y. R.; BASCUÑANA, C. R.; BÖLSKE, G.; MATTSSON, J. G.; MOLINA, C. F.; JOHANSSON, K.-E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from Mycoplasma bovis and Mycoplasma agalactiae by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 183–190, nov. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378113595000581>>. Acesso em: 14 set. 2014.

CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, H.; BEN SLAMA, K.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by Bacillus thuringiensis BMG1.7, a new strain isolated from soil. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n. 4, p. 243–7, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298934>>.

CHIAPPONI, C.; FACCINI, S.; DE MATTIA, A.; BAIONI, L.; BARBIERI, I.; ROSIGNOLI, C.; NIGRELLI, A.; FONI, E. Detection of Influenza D Virus among Swine and Cattle, Italy. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 2, p. 352–4, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812282>>.

COLLIN, E. A.; SHENG, Z.; LANG, Y.; MA, W.; HAUSE, B. M.; LI, F. Cocirculation of Two Distinct Genetic and Antigenic Lineages of Proposed Influenza D Virus in Cattle. **Journal of Virology**, v. 89, n. 2, p. 1036–1042, 15 jan. 2015. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02718-14>>.

CORBEIL, L. B.; WOODWARD, W.; WARD, A. C.; MICKELSEN, W. D.; PAISLEY, L. Bacterial interactions in bovine respiratory and reproductive infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 21, n. 5, p. 803–807, 1 maio 1985. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/long/21/5/803>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

COUTINHO, A. de S.; OLIVEIRA FILHO, J. P. de; SILVA, D. P. G. da; OLIVEIRA, A. P. de; MARCONDES, J. S.; CHIACCHIO, S. B.; PAES, A. C.; SIQUEIRA, A. K.; AMORIM, R. M.; GONÇALVES, R. C. Mannheimiose pulmonar experimental em bezerros: swab nasal e nasofaríngeano como auxílio diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 83–88, jan. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 5 out. 2014.

D'ARCE, R. C. ; ALMEIDA, R. ; SILVA, T. ; FRANCO, A. ; SPILKI, F.; ROEHE, P. ; ARNS, C. . Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 315–324, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113502001268>>.

DABO, S. M.; TAYLOR, J. D.; CONFER, A. W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 2, p. 129–150, 2007.

DECARO, N.; CIRONE, F.; MARI, V.; NAVA, D.; TINELLI, A.; ELIA, G.; DI SARNO, A.; MARTELLA, V.; COLAIANNI, M. L.; APREA, G.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Characterisation of bubaline coronavirus strains associated with gastroenteritis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. **Veterinary microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 245–51, 2010. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483547>>.

DICKSON, R. P.; HUFFNAGLE, G. B. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004923, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004923>>.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M. J. P.; MOOJEN, V.; ARNS, C. W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U. M. da. 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. DisponÃ-vel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X1997000200006&lng=pt&nrm=iso&tIng=pt>.

DUCATEZ, M. F.; PELLETIER, C.; MEYER, G. Influenza D Virus in Cattle, France, 2011–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, fev. 2015. DisponÃ-vel em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1449_article.htm>.

ELLIS, J. A. Bovine Parainfluenza-3 Virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 3, p. 575–593, 2010. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072010000356>>.

ELSHAFEE, S. I. M. A. **Isolation and characterization of aerobic bacteria associated with pneumonic lungs of cattle in singa slaughter house, sinnar state**. 2003. University of Khartoum, 2003.

FERGUSON, L.; ECKARD, L.; EPPERSON, W. B.; LONG, L.-P.; SMITH, D.; HUSTON, C.; GENOVA, S.; WEBBY, R.; WAN, X.-F. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. **Virology**, v. 486, p. 28–34, dez. 2015. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682215003888>>.

FERGUSON, L.; OLIVIER, A. K.; GENOVA, S.; EPPERSON, W. B.; SMITH, D. R.; SCHNEIDER, L.; BARTON, K.; MCCUAN, K.; WEBBY, R. J.; WAN, X.-F. Pathogenesis of Influenza D virus in Cattle. **Journal of virology**, 30 mar. 2016. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27030270>>.

FERNANDES, L. G.; DE CAMPOS NOGUEIRA, A. H.; DE STEFANO, E.; PITUCO, E. M.; RIBEIRO, C. P.; ALVES, C. J.; OLIVEIRA, T. S.; CLEMENTINO, I. J.; DE AZEVEDO, S. S. Herd-level prevalence and risk factors for bovine viral diarrhea virus infection in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. **Tropical animal health and production**, 24 out. 2015. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498460>>.

FIGUEROA-CHÁVEZ, D.; SEGURA-CORREA, J. C.; GARCÍA-MÁRQUEZ, L. J.; PESCADOR-RUBIO, A.; VALDIVIA-FLORES, A. G. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 7, p. 1417–21, 2012. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22270242>>.

FINCH J.M., H. C. J. Inhibitory effect of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma bovis* on bovine immune responses in vitro. In: STANEK G., CASSELL G.H., TULLY J.G., W. R. (Ed.). **Recent Advances in Mycoplasmaology**. [s.l.: s.n.]p. 563–569.

FISCHER, A.; SHAPIRO, B.; MURIUKI, C.; HELLER, M.; SCHNEE, C.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; VILEI, E. M.; FREY, J.; JORES, J. The origin of the “mycoplasma mycoides cluster” coincides with domestication of ruminants. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria, RS: UFMS, 2007.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; MEDEIROS, M.; BOTTON, S. A.; IRIGOYEN, L. F.; DRIEMEIER, D.; SCHUCH, L. F.; MORAES, M. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, dez. 2000. DisponÃ-vel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2000000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

FRANÇA DIAS DE OLIVEIRA, B. A.; CARRILLO GAETA, N.; MENDONÇA RIBEIRO, B. L.; REYES ALEMÁN, M. A.; MIRANDA MARQUES, L.; TIMENETSKY, J.; AVANSI MARQUES, J.; MELVILLE, P. A.; MARVULLE, V.; GREGORY, L. Determination of bacterial etiologic factor on tracheobronchial lavage in relation to clinical signs of bovine respiratory disease. **Journal of Medical Microbiology**, 30 ago. 2016. DisponÃ-vel em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000345.v1>>.

FRANCISCO, P. M. S. B.; DONALISIO, M. R.; BARROS, M. B. D. A.; CESAR, C. L. G.; CARANDINA, L.; GOLDBAUM, M. Medidas de associação em estudo transversal com delineamento complexo: razão de chances e razão de prevalência. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 3, p. 347–355, 2008.

FRANCO, A.C. & ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. (Ed.). **Virologia veterinária**. Santa Maria, RS: UFSM, 2007. p. 581–616.

FULTON, R. W. Bovine respiratory disease research (1983-2009). **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 10, n. 2, p. 131–139, 2009.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; ORE, S.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 1-2, p. 35–40, 2005.

GABINAITIENE, A., SIUGZDAITE J., ZILINSKAS H., SIUGZDA R., P. S. *Mycoplasma bovis* and bacterial pathogens in the bovine respiratory tract. **Veterinari Medicina**, v. 56, n. 1, p. 28–34, 2011.

GARG, D. N.; SHARMA, V. K. The detection of nasal carriers of salmonella and other enterobacteria amongst young farm animals. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie**, v. 243, n. 4, p. 542–6, jun. 1979. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/384721>>.

GERSHWIN, L. J. Bovine respiratory syncytial virus infection: immunopathogenic mechanisms. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, p. 207–213, 2007. DisponÃ-vel em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1466252307001405>>.

GERSTADT, K.; DALY, J. S.; MITCHELL, M.; WESSOLOSKY, M.; CHEESEMAN, S. H. Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 29, n. 1, p. 218–9, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433599>>.

GEVAERT, D. The importance of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease. **Tijdschrift voor diergeneeskunde**, v. 131, n. 4, p. 124–126, 2006.

GIOIA, J.; QIN, X.; JIANG, H.; CLINKENBEARD, K.; LO, R.; LIU, Y.; FOX, G. E.; YERRAPRAGADA, S.; MCLEOD, M. P.; MCNEILL, T. Z.; HEMPHILL, L.; SODERGREN, E.; WANG, Q.; MUZNY, D. M.; HOMSI, F. J.; WEINSTOCK, G. M.; HIGHLANDER, S. K. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into virulence, natural competence, and Pasteurellaceae phylogeny. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 20, p. 7257–7266, 2006.

GOLDSTEIN, E. J. C.; MURPHY, T. F.; PARAMESWARAN, G. I. *Moraxella catarrhalis*, a Human Respiratory Tract Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. 124–131, 2009. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/49/1/124>><<http://cid.oxfordjournals.org/content/49/1/124.full#ref-37>><<http://cid.oxfordjournals.org/content/49/1/124.full.pdf>>.

GONÇALVES, 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. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 953–956, out. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000500025&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

GONÇALVES, R. C. **Estudo da flora traqueobrônquica em bezerros clinicamente saudáveis e portadores de pneumonia, na região de Botucatu, SP**. 1987. Universidade Estadual Paulista, 1987.

GONÇALVES, R. C.; LISBÔA, J. A. N.; SOUSA, M. V. de; ALMEIDA, C. T. de; KUCHEMBUCK, M. R. G.; CHIACCHIO, S. B. Aspectos clínicos e epidemiológicos da broncopneumonia dos bezerros em Botucatu, SP. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 144–147, 2000. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2015.200>>.

GONÇALVES, R. C. O sistema respiratório na sanidade de bezerros. **2Ciência Animal Brasileira**, p. S.1., 2009.

GOURLAY, R. N.; LEACH, R. H. A New *Mycoplasma* Species Isolated From Pneumonic Lungs Of Calves (*Mycoplasma Dispar* Sp. Nov.). **Journal of Medical Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 111–123, 1 fev. 1970. Disponível em: <<http://jmm.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00222615-3-1-111>>. Acesso em: 7 out. 2014.

GOURLAY, R. N.; THOMAS, L. H.; HOWARD, C. J. Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. **The Veterinary Record**, v. 98, n. 25, p. 506–507, 1976.

GRIFFIN, D. Bovine Pasteurellosis and Other Bacterial Infections of the Respiratory Tract. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 57-71, 2010. .

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M. M.; KUSZAK, J.; MCVEY, D. S. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. **The Veterinary clinics of North America. Food**

animal practice, v. 26, n. 2, p. 381–94, jul. 2010. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619191>>. Acesso em: 5 out. 2014.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M. .; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 23–27, jan. 2004. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113503003584>>.

GUARINO, H.; NÚÑEZ, A.; REPISO, M. V.; GIL, A.; DARGATZ, D. A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1-2, p. 34–40, 2008. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587708000032>>.

GUINÉE, P.A.M., JANSEN, W.H., WADSTROM, T., SELLWOOD, R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and claves. **Topics in Veterinary Medicine and Animal Science**. p. 126-162, 1981.

GUO, X.; LI, D.; LU, W.; PIAO, X.; CHEN, X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 2, p. 139–146, 2006. DisponÃ-vel em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9067-9>>.

GUO, Y. J.; JIN, F. G.; WANG, P.; WANG, M.; ZHU, J. M. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. **The Journal of general virology**, v. 64 (Pt 1), p. 177–82, jan. 1983. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6296296>>.

HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 Years after Pasteur **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, n. 1, p. 1-10, 2006. .

HÄRTEL, H.; NIKUNEN, S.; NEUVONEN, E.; TANSKANEN, R.; KIVELÄ, S.-L.; AHO, R.; 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.

HAUSE, B. M.; COLLIN, E. A.; LIU, R.; HUANG, B.; SHENG, Z.; LU, W.; WANG, D.; NELSON, E. A.; LI, F. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. **mBio**, v. 5, n. 2, p. e00031–14–e00031–14, 4 mar. 2014. DisponÃ-vel em: <<http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00031-14>>.

HAUSE, B. M.; DUCATEZ, M.; COLLIN, E. A.; RAN, Z.; LIU, R.; SHENG, Z.; ARMIEN, A.; KAPLAN, B.; CHAKRAVARTY, S.; HOPPE, A. D.; WEBBY, R. J.; SIMONSON, R. R.; LI, F. Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003176, 7 fev. 2013. DisponÃ-vel em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003176>>.

HILTON, W. M. BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go? **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 15, n. 2, p. 120–2, 2014. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25358813>>.

HODGINS, D.; SHEWEN, P. Pneumonic Pasteurellosis. In: COETZER, J.; TUSTIN, R. (Ed.). **Infectious disease of livestock**. 2. ed. Cape Town: Oxford University Press, 2004. p. 1677–84.

HOLMAN, D. B.; MCALLISTER, T.; TOPP, E.; WRIGHT, A.-D. G.; ALEXANDER, T. W. The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811351500293X>>.

HOLMAN, D. B.; TIMSIT, E.; ALEXANDER, T. W. The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle. **Scientific Reports**, v. 5, p. 15557, 26 out. 2015. DisponÃ-vel em: <<http://www.nature.com/articles/srep15557>>.

HONKINEN, M.; LAHTI, E.; ÖSTERBACK, R.; RUUSKANEN, O.; WARIS, M. Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 300–7, mar. 2012.

HORWOOD, P. F.; GRAVEL, J. L.; MAHONY, T. J. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 7, p. 1643–1648, 1 jul. 2008. DisponÃ-vel em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.2008/000026-0>>.

HORWOOD, P. F.; MAHONY, T. J. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. **Journal of Virological Methods**, v. 171, n. 2, p. 360–363, fev. 2011. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093410004192>>.

HOWARD, C. J.; THOMAS, L. H.; PARSONS, K. R. Comparative pathogenicity of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma dispar* for the respiratory tract of calves. **Israel journal of medical sciences**, v. 23, n. 6, p. 621–624, 1987.

JASPER D.E., ALAUBAID J.M., F. J. Epidemiologic observations on mycoplasmaNo Title. **Cornell Veterinary**, v. 64, p. 407–415, 1974.

JUNGI, T. W.; KRAMPE, M.; SILEGHEM, M.; GRIOT, C.; NICOLET, J. Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by mycoplasmas. **Microbial pathogenesis**, v. 21, n. 6, p. 487–498, 1996.

JUSTICE-ALLEN, A.; TRUJILLO, J.; CORBETT, R.; HARDING, R.; GOODELL, G.; WILSON, D. Survival and replication of *Mycoplasma* species in recycled bedding sand and association with mastitis on dairy farms in Utah. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 1, p. 192–202, 2010.

KATAGIRI, S.; OHIZUMI, A.; HOMMA, M. An Outbreak of Type C Influenza in a Children's Home. **Journal of Infectious Diseases**, v. 148, n. 1, p. 51–56, 1 jul. 1983. DisponÃ-vel em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02718-14>>.

KÜMMERER, B. M.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; THIEL, H. J.; MEYERS, G. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. In: *Veterinary Microbiology*, 1-2, **Anais...**2000.

LONERAGAN, G. H.; DARGATZ, D. A.; MORLEY, P. S.; SMITH, M. A. Trends in mortality ratios among cattle in US feedlots. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1122–7, 15 out. 2001a. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700712>>.

LONERAGAN, G. H.; GOULD, D. H.; MASON, G. L.; GARRY, F. B.; YOST, G. S.; MILES, D. G.; HOFFMAN, B. W.; MILLS, L. J. Involvement of microbial respiratory pathogens in acute interstitial pneumonia in feedlot cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1519–1524, out. 2001b. DisponÃ-vel em:

<<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2001.62.1519>>.

LYSNYANSKY, I.; RON, Y.; YOGEV, D. Juxtaposition of an active promoter to vsp genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5698–5708, 2001.

MADIN, S. H.; YORK, C. J.; MCKERCHER, D. G. Isolation of the Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 721–722, 1956. DisponÃ-vel em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.124.3225.721>>.

MAEDA, T.; SHIBAHARA, T.; KIMURA, K.; WADA, Y.; SATO, K.; IMADA, Y.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. *Mycoplasma bovis*-associated Suppurative Otitis Media and Pneumonia in Bull Calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 100–110, ago. 2003. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997503000094>>.

MANSO-SILVÁN, L.; VILEI, E. M.; SACHSE, K.; DJORDJEVIC, S. P.; THIAUCOURT, F.; FREY, J. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1353–1358, 2009.

MARQUES L.M., M. BUZINHANI, M. YAMAGUTI, R.C.OLIVEIRA, E. METTIFOGO, J. T. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of calves in Brazil. **Veterinary Record**, v. 161, p. 699–700, 2007a.

MARQUES L.M., M. BUZINHANI, M. YAMAGUTI, R.C.OLIVEIRA, E. METTIFOGO, J. T. Use of a polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma dispar* in the nasal mucus of calves. **J Vet Diagn Invest**, v. 19, p. 103–106, 2007b.

MARRIE, T.J., FINE, M.J., OBROSKY, D.S., COLEY, C., SINGER, D.E., KAPOOR, W.N. Community-acquired pneumonia due to *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology infection**. v. 4, n. 12, p. 717–723, 1998.

MASOT, A. J.; KELLING, C. L.; LÓPEZ, O.; SUR, J. H.; REDONDO, E. In situ hybridization detection of bovine respiratory syncytial virus in the lung of experimentally infected lambs. **Veterinary pathology**, v. 37, n. 6, p. 618–25, 2000. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105951>>.

MATUA-ALUMIRA, R. W., NG'ANG'A, Z., KIARA, H., MATERE, C., MBITHI, F.; , MWIRIGI, M.; MAROBELLA-RABOROGWE, C.; AND SIDIADIE, S. The Prevalence of Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) in Cattle under Different Production Systems in Kajiado District, Kenya. In: 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns. **Anais...** Cairns: 2006. DisponÃ-vel em: <http://www.sciquest.org.nz/elibrary/download/64445/T2-S12_-_The_prevalence_of_contagious_bovine_pleur.pdf>.

MAUNSELL, F. P.; DONOVAN, G. A. *Mycoplasma bovis* Infections in Young Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, 2009.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347–350, abr. 2000. DisponÃ-vel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000200025&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus research**, v. 92, n. 2, p. 197–206, 2003. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686430>>.

METZLER, A. E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of virology**, v. 85, n. 1-2, p. 57–69, 1985. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2990389>>.

MEYERS, G. .; RÜMENAPF, T.; TAUTZ, N.; DUBOVI, E. J.; THIEL, H. J. Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus. **Archives of virology. Supplementum**, v. 3, p. 133–142, 1991.

MICHAEL W. SANDERSON, DAVID A. DARGATZ, and B. A. W. Risk factors for initial respiratory disease in United States' feedlots based on producer-collected daily morbidity counts. **Can Vet J.**, v. 49, n. 4, p. 373–378, 2008.

MILES, D. G. Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD). **Animal Health Research Reviews**, v. 10, p. 101–103, 2009. DisponÃ-vel em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1466252309990090>>.

MILES, K.; MCAULIFFE, L.; AYLING, R. D.; NICHOLAS, R. A. J. Rapid detection of *Mycoplasma dispar* and *M. bovirhinis* using allele specific polymerase chain reaction protocols. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, n. 1, p. 103–107, 2004.

MILLER, J.; HAIR, J.; HEBERT, M.; HEBERT, L.; ROBERTS, F. J.; WEYANT, R. Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus* [published erratum appears in J Clin Microbiol 1997 May;35(5):1294]. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 504–507, 1 fev. 1997. DisponÃ-vel em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/long/35/2/504>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

MITRA, N.; CERNICCHIARO, N.; TORRES, S.; LI, F.; HAUSE, B. M. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. **Journal of General Virology**, 5 maio 2016. DisponÃ-vel em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000492.v1>>.

MOORE, S. J.; O'DEA, M. A.; PERKINS, N.; O'HARA, A. J. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 1, p. 6–17, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1040638714559741>>.

MWEENE, A. S.; FUKUSHI, H.; PANDEY, G. S.; SYAKALIMA, M.; SIMUUNZA, M.; MALAMO, M.; NAMBOTA, A.; SAMUI, K. L.; TSUBOTA, T.; NAKAZATO, Y.; ONUMA, M.; YASUDA, J. The prevalence of bovine herpesvirus-1 in traditional cattle in Southern Province, Zambia. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 22, n. 3, p. 873–7, 2003. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005545>>.

NAGAI, M.; OZAWA, T.; ISHIKAWA, N.; KOMAE, H.; HAYAKAWA, Y.; NAKAZUWA, M. Isolation of *Moraxella catarrhalis* from Calves with Pneumonia. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 48, n. 5, p. 319–322, 1995. DisponÃ-vel em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvma1951/48/5/48_5_319/_article>.

NANDI, S.; KUMAR, M.; YADAV, V.; CHANDER, V. Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. **Transboundary and**

Emerging Diseases, v. 58, n. 2, p. 105–109, 2011. DisponÃ-vel em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1865-1682.2010.01185.x>>.

NEILL, J. D.; RIDPATH, J. F.; VALAYUDHAN, B. T. Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 112, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/112>>.

NETTLETON, P. E. G. Ruminant Pestiviruses. **British Veterinary Journal**, v. 151, p. 615–642, 1995.

NG, T. F. F.; KONDOV, N. O.; DENG, X.; VAN EENENNAAM, A.; NEIBERGS, H. L.; DELWART, E. A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. **Journal of Virology**, n. March, p. JVI.00064–15, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00064-15>>.

NICHOLAS, R. A. J. The other *M. bovis*: *Mycoplasma bovis*. **Livestock**, v. 15, n. 5, p. 32–34, 2010. DisponÃ-vel em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.2044-3870.2010.tb00305.x>>.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 2, p. 105–112, abr. 2003. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528802001558>>. Acesso em: 24 set. 2014.

NIKUNEN, S.; HÄRTEL, H.; ORRO, T.; NEUVONEN, E.; TANSKANEN, R.; KIVELÄ, S.-L.; SANKARI, S.; AHO, P.; PYÖRÄLÄ, 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, maio 2007. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147957106001044>>.

OHLSON, a; HEUER, C.; LOCKHART, C.; TRÅVÉN, M.; EMANUELSON, U.; ALENIUS, S. Risk factors for seropositivity to bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus in dairy herds. **The Veterinary record**, v. 167, n. 6, p. 201–206, 2010.

OIE. Contagious Bovine Pleuropneumonia. In: **Terrestrial Manual Online**. [s.l.: s.n.]

OIE. Contagious Bovine Pleuropneumonia. In: **Terrestrial Manual Online**. [s.l.] Organização Internacional de Epizootias, 2014b. p. 1–16.

OIE, W. O. for A. H. Infectious bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. 2010.

OIE, W. O. for A. H. **Bovine Viral Diarrhoea**.

OKIMOTO, N., HAYASHI, T., ISHIGA, M., NANBA, F., KISHIMITI, M., YAGI, S., KUHIIHARA, T., ASAIKA, N., TAMADA, S. Clinical features of *Proteus mirabilis* pneumonia. **Journal of Infection Chemotherapy**. v. 16, n. 5, p. 364–366.

OLIVEIRA, M. T. **Detecção de herpesvirus bovino tipo 1 (bohv-1) e tipo 5 (bohv-5) em amostras de sêmen & construção de um bohv-5 com uma deleção do gene ul49.5**. 2011. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; CUNHA, F.; VARGAS, F.; CARDOZO, E. On the use of a probiotic (*Bacillus subtilis* - strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, n. 2, p. 99–103, jun. 2007. DisponÃ-vel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2007000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

PACCAUD, M. F.; JACQUIER, C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 30, n. 4, p. 327–42, 1970. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4195627>>.

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. **The Veterinary record**, v. 169, p. 278, 2011.

PASQUALOTTO, W.; SEHNEM, S.; WINCK, C. A. Incidência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose em Bovinos Leiteiros da Região Oeste de Santa Catarina - Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 249, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/3034>>.

Pathological and Microbiological Studies on Pneumonic Lungs. v. 700, p. 693–700, 1999.

PELLERIN, J. L.; BOURDEAU, P.; SEBBAG, H.; PERSON, J. M. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 115–133, fev. 1998. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014795719700026X>>.

PEREIRA, L. O.; DANELLI, M. das G. M.; MAZUR, C.; GALLER, R. Identificação molecular de *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* tipo SC isolado do conduto auditivo externo de caprinos clinicamente saudáveis. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 367–368, abr. 2003. DisponÃ-vel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000200029&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 15, n. 4, p. 1477–1494, 1996.

PIOVESAN, M.; FERNANDES, M. H. V.; CORRÊA, R. a; PRADO, M. H. J.; CAMARGO, a. D.; RODRIGUES, P. R. C. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio Grande do sul. **Science and Animal Health**, v. 1, p. 38–49, 2013. DisponÃ-vel em: <<http://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/2609>>.

POLETTI, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 2004. DisponÃ-vel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200043&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

POUMARAT, F.; LE GRAND, D.; PHILIPPE, S.; CALAVAS, D.; SCHELCHER, F.; CABANIÉ, P.; TESSIER, P.; NAVETAT, H. Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 23–35, 2001.

PROVOST A., PERREAU P., BRÉARD A., LE GOFF C., MARTEL J.L., C. G. S. Contagious bovine pleuropneumonia. **Revue Scientifique et technique (International Office des Epizooties)**, v. 6, n. 3, p. 625–679, 1987. DisponÃ-vel em: <<http://www.oie.int/doc/ged/d8477.pdf>>.

QUAST, M.; SREENIVASAN, C.; SEXTON, G.; NEDLAND, H.; SINGREY, A.; FAWCETT, L.;

MILLER, G.; LAUER, D.; VOSS, S.; POLLOCK, S.; CUNHA, C. W.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; NELSON, E.; LI, F. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 3-4, p. 281–285, nov. 2015. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113515300237>>.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. D. O.; VARGAS, G. D. A.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul Prevalence and factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in South of Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 269–276, 2007.

QUINN P.J., MARKEY B.K., CARTER M.E., DONNELLY W.J., L. F. C. Gênero *Pasteurella* e a *Mannheimia haemolytica*. In: **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. [s.l.] Artmed, 2005. p. 143–148.

RAAPERI, K.; NURMOJA, I.; ORRO, T.; VILTROP, A. Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 96, n. 1-2, p. 74–81, 2010. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587710001674>>.

RAAPERI, K.; ORRO, T.; VILTROP, A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, p. 249–256, set. 2014. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023314002378>>.

RADOSTITS, O. M. Doenças Causadas por Riquetsias. In: **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1132–1146.

RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; R. N. MCELHANEY, L. R. FINCH, AND J. B. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Whashington: American Society for Microbiology, 1992. p. 3–22.

RAZIN, S. Mycoplasma. In: **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. [s.l.] Joh Wiley & Sons, 2010.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010. .

RAZIN SHMUEL, DAVID YOGEV, Y. N. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, 1998.

REISINGER, R. C.; HEDDLESTON, K. L.; MANTHEI, C. A. A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 135, n. 3, p. 147–152, 1959. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13672870>>.

RICE, J. A.; CARRASCO-MEDINA, L.; HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 2, p. 117–128, 2007.

RIDPATH, J. The contribution of infections with bovine viral diarrhea viruses to bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, 2010. .

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. In: **Biologicals**, 2, **Anais...**2003.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American journal of veterinary research**, v. 57, n. 1, p. 54–8, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720238>>.

ROGERS, M. J.; SIMMONS, J.; WALKER, R. T.; WEISBURG, W. G.; WOESE, C. R.; TANNER, R. S.; ROBINSON, I. M.; STAHL, D. A.; OLSEN, G.; LEACH, R. H. Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5S rRNA sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 4, p. 1160–1164, 1985.

ROIZMAN, B. & PELLETT, P. E. The Family Herpesviridae: A brief introduction. In: KNIPE, D.M. & HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia, USA: Lippincott–Raven, 2001. p. 2222–2229.

ROSENGARTEN, R.; CITTI, C.; GLEW, M.; LISCHIEWSKI, A.; DROESSE, M.; MUCH, P.; WINNER, F.; BRANK, M.; SPERGSE, J. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 290, n. 1, p. 15–25, 2000.

ROSSINI, A. J. **Contribuição ao estudo de micoplasmose bovina: isolamento de mycoplasma bovis em bezerros acometidos de pneumonia**. 1978. Universidade de São Paulo, 1978.

SAA, L. R.; PEREA, A.; JARA, D. V.; ARENAS, A. J.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; BORGE, C.; CARBONERO, A. Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 7, p. 1423–7, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22270243>>.

SAMARA, S.; DIAS, F.; MOREIRA, S. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo Occurrence of the bovine viral diarrhoea in the south region of the state of Minas Gerais and northeast region of the state of São Paulo. v. 41, p. 396–403, 2004.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. In: Veterinary Microbiology, 2-3, **Anais...**1999.

SANTOS, M. R.; FERREIRA, H. C. C.; SANTOS, M. A. dos; SARAIVA, G. L.; TAFURI, N. F.; SANTOS, G. M. dos; TOBIAS, F. L.; MOREIRA, M. A. S.; ALMEIDA, M. R. de; 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. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2014000200017&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

SARMIENTO-SILVA, R.; NAKAMURA-LOPEZ, Y.; VAUGHAN, G. Epidemiology, Molecular Epidemiology and Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3452–3467, 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/4/12/3452/>>.

SARRAZIN, S.; VELDHUIS, A.; MÉROC, E.; VANGEEL, I.; LAUREYNS, J.; DEWULF, J.; CAIJ, A. B.; PIEPERS, S.; HOOYBERGHS, J.; RIBBENS, S.; VAN DER STEDE, Y. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. **Preventive veterinary medicine**, v. 108, n. 1, p. 28–37, 1 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878124>>.

SCHNEE, C.; HELLER, M.; JORES, J.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H. Assessment of a novel multiplex real-time PCR assay for the detection of the CBPP agent *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC through experimental infection in cattle. **BMC veterinary research**, v. 7, p. 47, 2011.

SÉRY, A.; SIDIBÉ, C. A. K.; Cissé, O.; DIALLO, M.; KONÉ, M.; WARET-SZKUTA, A.; ROGER, F.; THIAUCOURT, F.; NIANG, M. Seroprevalence of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) in Mali. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 2, p. 395–402, 2014. DisponÃ-vel em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11250-014-0738-7>>.

SHAHANGIAN, A.; CHOW, E. K.; TIAN, X.; KANG, J. R.; GHAFARI, A.; LIU, S. Y.; BELPERIO, J. A.; CHENG, G.; DENG, J. C. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1910–1920, 2009.

SHAHRIAR, F. M.; CLARK, E. G.; JANZEN, E.; WEST, K.; WOBESER, G. Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. **The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne**, v. 43, n. 11, p. 863–868, 2002.

SHELBURNE, C. E.; AN, F. Y.; DHOLPE, V.; RAMAMOORTHY, A.; LOPATIN, D. E.; LANTZ, M. S. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 297–300, 13 nov. 2006. DisponÃ-vel em: <<http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkl495>>.

SIUGZDAITE, J. Detection of *Mycoplasma bovis* from Hayflick-agar media by polymerase chain reaction. **Veterinarija**, n. 1, p. 67–70, 2002.

ŠIUGŽDAITĖ, J.; GABINAITIENĖ, A.; ŠIUGŽDA, R. *Mycoplasma dispar* prevalence in the upper respiratory tract of cattle and the antimicrobial susceptibility of the isolates. **Chemical Technology**, v. 65, n. 1, 2015. DisponÃ-vel em: <<http://www.chemtech.ktu.lt/index.php/Chem/article/view/8716>>.

SNOWDER, G. D. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 1999–2008, 1 ago. 2006. DisponÃ-vel em: <<http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/84/8/0841999>>.

SOLÍS-CALDERÓN, 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. 1-2, p. 102–110, 2007. DisponÃ-vel em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587707001262>>.

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. 3-4, p. 253–62, 12 dez. 2005. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153725>>.

STIPKOVITS, L.; RIPLEY, P.; VARGA, J.; PÁLFI, V. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 48, n. 4, p. 387–395, 2000.

STIPKOVITS L., GLÁVITS R., RIPLEY P., et al. Pathological and immunohistochemical studies of pneumonia in calves experimentally induced by *Mycoplasma bovis*. In: Bergonier

D, Berthelot X, Frey J, editors. Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. **Brussels (Belgium): European Commision**, p. 27–30, 2000.

SUN, K.; METZGER, D. W. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. **Nature medicine**, v. 14, n. 5, p. 558–564, 2008.

SWAI, E.; MWEZIMPYA, I.; ULICKY, E.; MBISE, A.; MOSHY, W. An abattoir survey of contagious bovine pleuropneumonia lesions in slaughtered cattle in selected districts in Northern Tanzania. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 4, p. 303–306, 2013.

SY, M. G.; ROBINSON, J. L. Community-acquired *Moraxella catarrhalis* pneumonia in previously healthy children. **Pediatric pulmonology**, v. 45, n. 7, p. 674–8, jul. 2010.

SZEREDI, L.; JÁNOSI, S.; PÁLFI, V. Microbiological and pathological examination of fatal calf pneumonia cases induced by bacterial and viral respiratory pathogens. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 58, n. 3, p. 341–356, set. 2010. DisponÃ-vel em: <<http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/AVet.58.2010.3.7>>.

TALAFHA, A. Q.; HIRCHE, S. M.; ABABNEH, M. M.; AL-MAJALI, A. M.; ABABNEH, M. M. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical animal health and production**, v. 41, n. 4, p. 499–506, abr. 2009. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654834>>.

TANNER, M. A.; EVERETT, C. L.; YOUVAN, D. C. Molecular Phylogenetic Evidence for Noninvasive Zoonotic Transmission of *Staphylococcus intermedius* from a Canine Pet to a Human. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1628–1631, 1 abr. 2000. DisponÃ-vel em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/long/38/4/1628>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

TAYLOR, J. D.; FULTON, R. W.; LEHENBAUER, T. W.; STEP, D. L.; CONFER, A. W. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 51, n. 10, p. 1095–102, out. 2010. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21197200>>.

TER LAAK, E. A.; NOORDERGRAAF, J. H.; DIJLTJES, R. P. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 39, n. 8, p. 553–562, 1992.

TER LAAK, E. A., NOORDERGRAAF, J. H. & BOOMSLUITTER, E. The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, p. 610–616, 1992.

THEURER, M. E.; ANDERSON, D. E.; WHITE, B. J.; MIESNER, M. D.; MOSIER, D. A.; COETZEE, J. F.; LAKRITZ, J.; AMRINE, D. E. Effect of Mannheimia haemolytica pneumonia on behavior and physiologic responses of calves during high ambient environmental temperatures. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 8, p. 3917–3929, 2013.

THOMAS, A.; BALL, H.; DIZIER, I.; TROLIN, A.; BELL, C.; MAINIL, J.; LINDEN, A. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. **The Veterinary record**, v. 151, n. 16, p. 472–476, 2002.

THOMAS L.H., HOWARD C.J., STOTT E., P. K. R. Mycoplasma bovis infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. **Veterinary Pathology**, v. 23, p. 571–578, 1986.

THORNS, C. J. Identification of the products of the “film spots” reaction of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis*. **Journal of biological standardization**, v. 6, n. 2, p. 127–132, 1978.

TIMSIT, E.; HOLMAN, D. B.; HALLEWELL, J.; ALEXANDER, T. W. The nasopharyngeal microbiota in feedlot cattle and its role in respiratory health. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 2, p. 44, 2016. DisponÃ-vel em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/af/abstracts/6/2/44>>.

USDA. Feedlot 2001. Part IV: Health and Health Management on U.S. Feedlots with a capacity of 1,000 or more head. In: **APHIS**. Fort Collins: National Animal Health Monitoring System, 2013.

UTTENTHAL, A.; LARSEN, L. E.; PHILIPSEN, J. S.; TJORNEHOJ, K.; VIUFF, B.; NIELSEN, K. H.; NIELSEN, T. K. Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p. 329–341, 2000. DisponÃ-vel em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00261-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00261-3)>.

VALARCHER, J.-F.; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Veterinary research**, v. 38, n. 2, p. 153–80, 2007. DisponÃ-vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257568>>.

VAN DER FELS-KLERX, H. J.; MARTIN, S. W.; NIELEN, M.; HUIRNE, R. B. M. Effects on productivity and risk factors of Bovine Respiratory Disease in dairy heifers; a review for the NetherlandsNJAS - **Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 50, n. 1, p. 27-46, 2002. .

VAN DER FLIER, M.; CHHUN, N.; WIZEMANN, T. M.; MIN, J.; MCCARTHY, J. B.; TUOMANEN, E. I. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4317–4322, 1995.

VANDEN BUSH, T. J.; ROSENBUSCH, R. F. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 94, n. 1-2, p. 23–33, 2003.

VIRTALA, A.; MECHOR, G. D.; GRÖHN, Y. T.; ERB, H. N. Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life.**Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, n. 12, p. 2043-2046, 1996. .

WESTBERG, J.; PERSSON, A.; HOLMBERG, A.; GOESMANN, A.; LUNDEBERG, J.; JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). **Genome Research**, v. 14, n. 2, p. 221–227, 2004.

WIJEWARDANA, T. G.; WILSON, C. F.; GILMOUR, N. J. L.; POXTON, I. R. Production of mouse monoclonal antibodies to *Pasteurella multocida* type A and the immunological properties of a protective anti-lipopolysaccharide antibody. **Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 217–222, 1990.

WILSON, J.H., LOFSTEDT, J. Alterations in respiratory function. In: **Large Internal Medicine**. [s.l.: s.n.]p. 47–99.

YOU, X.; ZENG, Y.; WU, Y. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 7, n. 5, p. 342–350, 2006.

ZINKA M., M. R. MYCOPLASMAS ISOLATED FROM THE RESPIRATORY TRACT OF CATTLE IN BOSNIA AND HERZEGOVINA. **AN. VET. (MURCIA)**, v. 28, p. 79–83, 2012.

ANEXO A - Meio de transporte para micoplasmas e ureaplasmas

Para preparo de 200 mL:

- Sacarose (Synth®) 8,0g
- Fosfato de sódio monobásico (Synth®) 0,2g
- Fosfato de sódio dibásico (Synth®) 0,4g

Autoclavar por 20 minutos a 121 °C

Após autoclavagem, acrescentar os seguintes suplementos:

- Soro fetal equino estéril (Vitrocell®).....100,0 mL
- Acetato de tálio (Inlab®)1,0 mL
- Penicilina100,0 µL

ANEXO B - Meio de cultivo para micoplasma

Para preparo de 1000 mL

-Tryptone (DIFCO®)	10,0g
-Peptona (Merck®)	5,3g
-Mycoplasma Broth Base (BBL®).....	3,5g
-Água deionizada	750,0mL
Ágar noble - para meio sólido (DIFCO®).....	10,0g

Ajustar pH entre 7.4 e 7.8

Autoclavar a 121°C por 20 minutos;

Suplementar o meio base, assepticamente, no momento do uso:

- Soro fetal equino estéril (Vitrocell®)	180mL
-199	50mL
-Extrato de levedura	35mL
-Glicose 10%	10mL
-Arginina 10%	1mL
-Yeastolate 20% (DIFCO®).....	10mL
- Vermelho de Fenol 0,05%	4mL
- Acetato de Tálho 1% (Inlab®)	10mL
-Penicilina	1mL

ANEXO C - Ficha clínica

FICHA CLÍNICA – EXAME DO SISTEMA RESPIRATÓRIO					
IDENTIFICAÇÃO:		RAÇA:		IDADE:	
PROPRIETÁRIO:		SEXO: M ☐ F ☐			
PROPRIEDADE:		MUNICÍPIO:			
EXAME CLÍNICO GERAL					
NÍVEL DE CONSCIÊNCIA: ALERTA ☐ DEPRIMIDO ☐ APÁTICO ☐ EXCITADO ☐					
ESCORE CORPORAL: 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐					
DESIDRATAÇÃO: NÃO APARENTE ☐ LEVE ☐ MODERADA ☐ GRAVE ☐ GRAVÍSSIMA ☐					
FC:	bpm	FR:	mrpm	T:	°C
MR:	/	min	TPC:	seg.	
MUCOSAS: RÓSEAS ☐ PÁLIDAS ☐ HIPERÊMICAS ☐ ICTÉRICAS ☐ CIANÓTICAS ☐					
EXAME CLÍNICO ESPECÍFICO - NARINAS, FOSSAS NASAIS					
TOSSE: SIM ☐ _____ NÃO ☐		CORRIMENTO NASAL: FLUIDO ☐ SEROSO ☐ MUCOSO ☐ PURULENTO ☐ HEMORRÁGICO ☐			
LESÕES NARINA: NÃO ☐ SIM: _____		ODOR NASAL: ACETONA ☐ AMÊNDOA ☐ PÚTRIDO ☐ OUTRO ☐			
FLUXO DE AR: IGUAL ☐ DESIGUAL ☐		PALPAÇÃO:		PERCUSSÃO:	
EXAME CLÍNICO ESPECÍFICO – TÓRAX					
TIPO RESPIRATÓRIO: COSTOABDOMINAL ☐		COSTAL ☐		ABDOMINAL ☐	
PERCUSSÃO: CLARO ☐ SUBMACIÇO ☐ MACIÇO ☐ METÁLICO ☐ TIMPÂNICO ☐					
AUSCULTAÇÃO: CREPITAÇÃO GROSSA ☐ CREPITAÇÃO FINA ☐ SIBILO ☐					
INSPIRAÇÃO INTERROMPIDA ☐		RONCO ☐		ROCEPLEURAL ☐	
RUPIDO CARDIOPLEURAL ☐		RUIDO CARDIOPULMONAR ☐		BRONCOFONIA ☐	
<div style="text-align: center;"> </div>					
Observações:					