



DÉBORA RIBEIRO ORLANDO

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-
HISTOQUÍMICO E MOLECULAR DAS
PRINCIPAIS CAUSAS INFECCIOSAS DE
ABORTO EM BOVINOS DE MINAS GERAIS**

LAVRAS – MG

2013

DÉBORA RIBEIRO ORLANDO

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E
MOLECULAR DAS PRINCIPAIS CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTO
EM BOVINOS DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Mary Suzan Varaschin

LAVRAS-MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e Serviços
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Orlando, Débora Ribeiro.

Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular
das principais causas infecciosas de aborto em bovinos de Minas
Gerais / Débora Ribeiro Orlando. – Lavras : UFLA, 2013.
101 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Mary Suzan Varaschin.
Bibliografia.

1. Feto. 2. Protozoário. 3. Vírus. 4. Bactéria. 5. Diagnóstico. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.0896075

DÉBORA RIBEIRO ORLANDO

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E
MOLECULAR DAS PRINCIPAIS CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTO
EM BOVINOS DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Julho de 2013.

Dr. Enio Ferreira	UFMG
Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior	UFLA
Dr. Djeison Lutier Raymundo	UFLA

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

Dedico este trabalho aos meus pais (Anelícia e Ivanir) e irmãos (Vanessa, Paty e Jú) que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los;

Ao Eric, companheiro no amor, na vida e sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilhou comigo as alegrias, tristezas e dificuldades;

Eles são meus alicerces e fazem parte das minhas mais belas páginas da vida....

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha Luz e meu Guia, principalmente nos momentos em que eu pensava estar só, por segurar minha mão enquanto eu caminhava por estradas muitas vezes, tortuosas. Obrigada pela família, verdadeiros amigos e oportunidades;

Aos meus pais, Ivanir e Anelícia, que sempre estiveram me apoiando, que compreenderam minhas faltas e a dor da distância. Foram eles que também me deram a segurança nos momentos de medo e incerteza;

Aos meus irmãos e amores Vanessa, Patrícia e Júnior, pelo companheirismo e cumplicidade;

Aos meus tios, tias e avó que sempre torceram por mim. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu namorado, Eric Francelino, a quem eu amo muito. Foi em você que, em muitos momentos de choro, tristeza e desânimo encontrei meu “porto-seguro”. Obrigada por ter dado mais sentido a minha vida, sem você eu não estaria onde estou;

Aos amigos da Patologia Veterinária, especialmente ao Leo, Priscila Rosa, Rafael Carneiro, Natália e Priscilla Akiko;

À minha orientadora Mary S. Varaschin, demais professores, estagiários e funcionários;

Obrigada aos professores da banca por aceitarem o convite para participarem de algo tão importante;

Aos professores Renato Lima (UFMG), Eduardo Flores (pelos anticorpos cedidos), Djeison Lutier Raymundo (UFLA), Roberta Piccoli (UFLA), Francisco Vieira (UFMG) e Ana Paula Peconick (UFLA), pela colaboração na realização deste projeto;

Aos amigos Bruno Antunes Soares, Raquel Vieira e outros amigos com quem tive o prazer de trabalhar, com quem aprendi muito e dividi muitas risadas;

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro e toda a equipe da pós-graduação em Ciências Veterinárias.

“Tudo passa...

Todas as coisas na Terra passam.

Os dias de dificuldade passarão...

Passarão, também, os dias de amargura e solidão.

As dores e as lágrimas passarão.

As frustrações que nos fazem chorar.. Um dia passarão.

A saudade do ser querido que está longe, passará.

Os dias de tristeza...

Dias de felicidade...

São lições necessárias que, na Terra, passam, deixando no espírito imortal as experiências acumuladas.

Se, hoje, para nós, é um desses dias,

repleto de amargura, paremos um instante.

Elevemos o pensamento ao Alto

e busquemos a voz suave da Mãe amorosa,

a nos dizer carinhosamente: 'isto também passará'

E guardemos a certeza pelas próprias dificuldades já superadas que não há mal que dure para sempre,

semelhante a enorme embarcação que, às vezes, parece que vai soçobrar diante das turbulências de gigantescas ondas.

Mas isso também passará porque Jesus está no leme dessa Nau

e segue com o olhar sereno de quem guarda a certeza de que a

agitação faz parte do roteiro evolutivo da Humanidade

e que um dia também passará.

Ele sabe que a Terra chegará a porto seguro

porque essa é a sua destinação.

Assim, façamos a nossa parte o melhor que pudermos,

sem esmorecimento e confiemos em Deus,

aproveitando cada segundo, cada minuto que, por certo, também passará.

Tudo passa... exceto Deus.

Deus é o suficiente!”

Chico Xavier

RESUMO GERAL

A pecuária desempenha um papel importante na economia do Brasil, sendo que, as doenças que cursam com perdas reprodutivas, sempre resultaram em um custo substancial para o produtor. Assim, a perda de um animal decorrente de um aborto infeccioso é preocupante, pois não envolve somente a perda daquele animal, mas o acometimento da saúde da fêmea que estava gestante. Além disso, se tratando de um agente infeccioso, a possibilidade deste se disseminar no rebanho e, em alguns casos, de acometer a saúde do ser humano deve ser também considerada. Infelizmente, a etiologia do aborto, muitas vezes, permanece obscura, apesar dos extensivos esforços para se chegar a um diagnóstico. Nos rebanhos brasileiros, em função da diversidade de criação e muitas vezes, pela falta de informação de alguns produtores, pouco se conhece sobre a real frequência destes agentes causadores de abortos. Desta forma com este estudo tem-se por objetivo contribuir para o conhecimento dos principais agentes etiológicos envolvidos em abortos bovinos no Estado de Minas Gerais. Para isso, foi realizado um estudo retrospectivo de 10 anos dos casos de abortos recebidos pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras, juntamente com a realização de necropsias de fetos encaminhados para diagnóstico num período de dois anos e meio (2011-2013). Os abortos foram classificados em abortos por protozoário, por vírus ou de origem bacteriana conforme a lesão histopatológica predominante. Posteriormente, foram realizados estudos imuno-histoquímicos de 30 fetos e testes moleculares em 11 fetos. Os resultados encontrados foram divididos em dois trabalhos, o primeiro trabalho apresenta o *Neospora caninum* como o principal agente causador de aborto respondendo por 31,66% dos abortos bovinos. Quando excluídos fetos impróprios para o exame devido à autólise acentuada ou os sem lesões microscópicas, os abortos por *N. caninum* chegam a 63,3%. Este trabalho também apresenta o músculo cardíaco e esquelético como os locais de maior frequência das lesões causadas pelo protozoário e apresenta a eficiência dos testes imuno-histoquímicos e moleculares para o sucesso do diagnóstico. Já no segundo artigo relata-se os agentes bacterianos e virais causadores de abortos em bovinos diagnosticados neste estudo. Dentre eles, encontram-se o Herpesvírus bovino, *Brucella* sp., *Leptospira* sp. e *Staphylococcus* sp.. Os resultados deste estudo destacam o *N. caninum* como um importante agente causador de aborto bovino no Sul de Minas Gerais, seguido pelos agentes bacterianos e virais. Além disso, reforça que a técnica de diagnóstico molecular foi mais sensível em comparação à imuno-histoquímica na realização do diagnóstico.

Palavras-chave: Aborto bovino. Herpesvírus bovino. *Neospora caninum*.
Brucella sp. *Leptospira* sp.

GENERAL ABSTRACT

Cattle breeding plays an important role in Brazil's economy, and the diseases associated with reproductive failure always resulted in a substantial cost to the producer. Thus, the loss of an animal due to an infectious abortion is worrisome because it involves not only the loss of that animal, but the health of the pregnant female. Furthermore, when dealing with an infectious agent, the possibility of it spreading in the herd and, in some cases, affecting the health of the human being, should also be considered. Unfortunately, the etiology of abortion often remains unclear despite extensive efforts to reaching a diagnosis. In Brazilian herds, due to the diversity of the breeding, and often the lack of information of some producers, little is known about the real frequency of the abortions agents. Therefore, this study aims to contribute in the knowledge of the main etiological agents involved in bovine abortions in the state of Minas Gerais, Brazil. In order to do this, we performed a 10 year retrospective study of abortions received by the Veterinary Pathology Sector of the Universidade Federal de Lavras, along with performing necropsies of fetuses forwarded for diagnosis in a period of two and a half years (2011-2013). The abortions were classified as abortions by protozoan, by virus or of bacterial origin, according to the predominant microscopic lesions. Posteriorly, we performed immunohistochemical studies on 30 fetuses, and molecular studies on 11 fetuses. The results were divided into two papers. The first paper presents the *Neospora caninum* as the main abortion agent, responsible for 31.66% of the bovine abortions. When excluding the fetuses improper for the exam due to accentuated autolysis or those without microscopic lesions, the abortions caused by *N. caninum* reach 63.3%. This paper also presents the cardiac and skeletal muscles as the locations of largest lesion frequency caused by this protozoan, and presents the efficiency of the immunohistochemical and molecular tests in the success of the diagnosis. The second paper reports the bacterial and viral agents associated with bovine abortion diagnosed in this study. Among them we found the bovine herpes virus and the bacteria *Brucella* sp, *Leptospira* sp and *Staphylococcus* sp. The results of this study highlight the *N. caninum* as an important agent of bovine abortion in Southern Minas Gerais, followed by the bacterial and viral agents. Furthermore, it reinforces that the molecular diagnosis was more sensitive in comparison to the immunohistochemical diagnosis.

Keywords: Bovine abortion. Bovine Herpesvirus. *Neospora caninum*. *Brucella* sp. *Leptospira* sp.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Fig. 1. Estudo retrospectivo e prospectivo de casos de aborto por Neospora caninum em bovinos. Número de casos e idade gestacional dos fetos abortados.....7171
- Fig. 2. Aborto por Neospora caninum em bovinos. Coração. Miocardite mononuclear acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.....7272
- Fig. 3. Aborto por Neospora caninum em bovinos. Músculo esquelético. Miosite mononuclear acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj. 20.....722
- Fig. 4. Aborto por Neospora caninum em bovinos. Córtex cerebral. Área focal de necrose circundada por células da glia.Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.....7373
- Fig.5. Aborto por Neospora caninum em bovinos. Músculo esquelético. Cisto jovem entre as fibras musculares (seta). Hematoxilina-Eosina. Obj.40.....7373
- Fig.6. Aborto por Neospora caninum em bovinos. Córtex cerebral. Taquizoítos marcados positivamente pelo anticorpo policlonal anti-N. caninum Imuno-histoquímica avidina-biotina. Obj. 100..... **Erro! Indicador não definido.**4
- Fig.7. Aborto por Neospora caninum em bovinos. Musculatura da língua. Taquizoítos marcados positivamente pelo anticorpo policlonal anti-N. caninum. Imuno-hitoquímica avidina-biotina. Obj. 40.....7474

ARTIGO 2

- Fig. 1. Brucelose. Cavidade torácica de feto bovino. Presença de líquido avermelhado e espessa camada de fibrina envolvendo o pulmão.91
- Fig.2. Brucelose. Cavidade abdominal de feto bovino. Omento e as alças intestinais envoltos por uma espessa camada de fibrina.91
- Fig. 3. Leptospirose. Tecido Subcutâneo de feto bovino apresentando icterícia discreta92
- Fig.4. Leptospirose. Fígado de feto bovino aumentado de volume, com uma coloração mais avermelhada e com algumas áreas amareladas.922
- Fig. 5. Leptospirose. Timo de feto bovino apresentando petéquias (seta).933
- Fig. 6. Herpesvírus bovino tipo 1. Baço de feto bovino apresentando fragmentação de células. Hematoxilina-Eosina. Obj.40.....933
- Fig. 7. Herpes vírus bovino tipo 1. Baço de feto bovino. Imunomarcção positiva no citoplasma de células linfóides. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 40.....944
- Fig. 8. Herpes vírus bovino tipo 1. Baço de feto bovino. Imunomarcção positiva em células linfóides do baço. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 20944
- Fig. 9. Herpes vírus bovino tipo 1. Tálamo de feto bovino com Imunomarcção positiva em neurônios. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj.40.....955
- Fig. 10. Herpes vírus bovino tipo 1. Colículo caudal de feto bovino com Imunomarcção positiva no citoplasma de células endoteliais. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 40.....955

Fig. 11.	Brucelose. Pulmão de feto bovino apresentando pleurite fibrinosa. Hematoxilina-Eosina. Obj.20..	9696
Fig. 12.	Brucelose. Meninge de feto bovino apresentando meningite mononuclear acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj.40.....	9696
Fig. 13.	Brucelose. Imunomarcção positiva para <i>Brucella abortus</i> no citoplasma de células inflamatórias presentes na pleura de feto bovino. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj.40.	977
Fig. 14.	Brucelose. Pulmão de feto bovino com células necróticas no interior de brônquio e alvéolos. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.....	977
Fig. 15.	Brucelose. Pulmão de feto bovino com marcação positiva de bactérias no citoplasma de macrófagos. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 40.....	9898
Fig. 16.	Aborto bacteriano. Pulmão de aborto bovino com pneumonia purulenta difusa acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.....	9898
Fig. 17.	<i>Staphylococcus</i> sp. Pulmão de feto bovino com infiltrado de neutrófilos nos alvéolos e bactérias basofílicas aderidas à superfície dos mesmos. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.....	99
Fig. 18.	Leptospirose. Rim de feto bovino com nefrite intersticial mononuclear. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.	9999
Fig. 19.	Leptospirose. Rim de feto bovino Com nefrite intersticial mononuclear. Hematoxilina-Eosina. Obj.40.....	1000
Fig. 20.	Leptospirose. Fígado de feto bovino com intenso infiltrado mononuclear e bilestase dentro do citoplasma de hepatócitos. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.....	1011

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Tabela 1. Local de imunomarcção para *Neospora caninum* e idade gestacionalem que ocorreu o aborto **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 2. Relação dos tecidos positivos na técnica de PCR para *N. caninum* em fetos do Sul do Estado de Minas Gerais 755
- Tabela 3. Comparação dos resultados das técnicas de imunohistoquímica e PCR em relação a confirmação de dignóstico de *Neospora caninum* 766

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 16
2	REFERENCIAL TEÓRICO 19
2.1	Neosporose 19
2.2	Herpesvírus 24
2.3	Vírus da Diarreia Viral Bovina 28
2.4	Brucelose 33
2.5	Leptospirose 37
2.6	Listeriose 40
2.7	Campilobacteriose 42
2.8	Outras bactérias e protozoários causadores de aborto 44
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS 46
	REFERÊNCIAS 47
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS 61
	ARTIGO 1 Abortos por <i>Neospora caninum</i> em bovinos do sul do estado de Minas Gerais, Brasil 61
	ARTIGO 2 Agentes bacterianos e virais causadores de aborto bovino no sul do estado de MINAS GERAIS, BRASIL 777

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem um grande papel na economia do país, sendo que o Brasil possui o segundo maior rebanho do mundo (aproximadamente 190,9 milhões de cabeças) ficando atrás somente da Índia que possui um total de 316, 4 milhões. Porém, o rebanho deste país não é comerciável (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012).

Uma das principais causas de perdas econômicas e de preocupação para o produtor de bovinos é a ocorrência de abortos, pois envolve a perda de um animal, atraso nas concepções e acometimento da saúde da fêmea que sofreu o aborto. Além disso, se a causa for infecciosa, pode se disseminar para todo o rebanho e causar prejuízos maiores.

Entre as diversas etiologias do aborto, destacam-se as de origem infecciosas, que podem ser divididas em quatro grupos e, dentre estes grupos, algumas são mais prevalentes e possíveis de serem diagnosticadas nos fetos. Por exemplo, o aborto causado pelo protozoário *Neospora caninum*, pelas bactérias *Brucella abortus*, *Leptospira* spp, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp, por vírus como o Vírus da Diarreia Viral Bovina (DVB) e Herpesvírus Bovino tipo I (HVB-1), e menos frequentemente por fungos, como o *Aspergillus* sp. Muitos desses patógenos transmitidos verticalmente possuem a característica comum de originarem uma leve ou inaparente “doença” em animais não prenhes, mas podem causar abortos em ruminantes (ENTRICAN, 2002).

Embora algumas doenças infectocontagiosas que cursam com aborto sejam bastante disseminadas no Brasil, para muitas delas, não se sabe a real situação epidemiológica. Isso decorre pelo fato de um pequeno número de laboratórios realizarem o diagnóstico destas patologias, assim como, há uma

baixa identificação e notificação dos casos por veterinários e proprietários (RIET-CORREA et al., 2007).

Taxas de perda fetal de 5-6% ocorrem em bovinos desde o diagnóstico de gestação até o parto (JONKER, 2004). Porém, agentes infecciosos podem contribuir para a mortalidade embrionária, irregularidades em cio e também ocorrência de abortos. Dados descritos na literatura afirmam que um animal que sofre de brucelose tem queda de 10-25% da eficiência reprodutiva, passando a ser um animal problema dentro do rebanho (BRASIL, 2006).

Ainda se tratando de falha reprodutiva, a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), causada pelo Herpesvírus bovino tipo 1, pode causar aborto em até 30% das fêmeas prenhes entre 3 a 6 semanas de infecção (ALFIERI; ALFIERI; MÉDICI, 1998). Em relação à DVB como causa de aborto, a porcentagem pode variar de 2 a 7% (SCHMITZ, 2006).

Levantamentos feitos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (1999) demonstraram que a causa de aborto por leptospirose pode variar de 3 a 10%, tendo dessa forma, esta bactéria, uma baixa participação em abortos. Outras causas de aborto, presentes no rebanho brasileiro, também causam prejuízos em outros países como, por exemplo, a Campilobacteriose. Essa, no Uruguai é responsável por 9.8 a 11% dos abortos estudados no período de 1996 a 2002 (EASTON; PAULLIER; BAÑALES, 2003).

Além dos agentes bacterianos mais frequentemente encontrados, um grande número de bactérias, com patogenicidade variáveis podem estar associadas a causas de aborto. Alguns são a *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus*, *Nocardia*, entre outras (KIRKBRIDE, 1990). Nestes casos é necessário, lançar mão de mais de uma técnica, como por exemplo, a cultura microbiológica e PCR para definição do diagnóstico.

O envio de fetos e placenta para a realização de necropsia, exame histopatológico, imuno-histoquímico, em associação com exames sorológicos,

microbiológicos e/ou PCR são fundamentais para o sucesso do diagnóstico das causas de aborto em um rebanho. É importante salientar que muitos fetos podem apresentar adiantado estado de autólise, dificultando o isolamento e identificação do agente por cultivo, sendo a imuno-histoquímica um método viável e importante para o diagnóstico (LOEB, 2004; RISSI et al., 2006; SANTOS et al., 1998).

Além disso, também há outras situações em que a imuno-histoquímica apresenta importância no diagnóstico. Exemplo disso ocorre quando as lesões possuem número reduzido do agente ou pouca quantidade de antígeno ou quando o material a ser testado é enviado já fixado em formol para o laboratório e quando o cultivo e/ou algumas colorações especiais podem resultar e falso negativo (RISSI et al., 2006).

A técnica de PCR também é indicada como método de diagnóstico em suspeitas de aborto por protozoários, uma vez que, nem sempre este agente é de fácil visualização em cortes de tecidos (SANTOS et al., 2011). A viabilidade das técnicas de diagnóstico molecular, por serem baseadas na detecção de porções genômicas, oferece, entre outros benefícios, a possibilidade de superar a baixa sensibilidade de outras técnicas (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996).

Por isso é extremamente importante estabelecer a prevalência dessas doenças para que possam ser adotadas medidas preventivas (KANUYA et al., 2006). Além de perdas econômicas, estas podem constituir um problema de saúde pública, já que algumas destas doenças são consideradas zoonoses (JONKER et al., 2004).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo contribuir com o conhecimento das principais causas infecciosas de aborto bovino do Sul de Minas Gerais por meio de necropsia de fetos encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras, somado a um estudo retrospectivo de dez anos de casos presentes no arquivo de diagnóstico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Neosporose

Neospora caninum é um protozoário coccídeo, intracelular obrigatório que pode infectar várias espécies animais, dentre elas, canídeos domésticos e selvagens, bovinos, equídeos (ADREOTTI et al., 2010) e caprinos (DUBEY, 2003; MESQUITA et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012), entre outras. Este parasito possui uma eficiente capacidade de transmissão dentro do rebanho, podendo infectar até 90% dos animais (DUBEY; BUXON; WOUDA, 2006).

O *N. caninum* é considerado um dos principais agentes etiológicos causador de aborto em bovinos (DUBEY, 2003). Logo, é responsável por grandes perdas econômicas. Em uma revisão realizada por Reichel et al. (2013) chegou-se ao cálculo de que o *N. caninum* é responsável por uma perda anual estimada de 51,3 milhões de dólares na pecuária leiteira do Brasil (podendo chegar a uma variação de 35,8 milhões a 113,3 milhões de dólares). Já no setor de carne, sua perda anual chega a somar 101 milhões de dólares.

Em seu ciclo há a presença de hospedeiros intermediários (HI) e definitivos (HD). Os hospedeiros definitivos podem ser canídeos domésticos e/ou selvagens. Já os intermediários podem ser várias espécies animais (DUBEY; SCHARES, 2011). Também é descrito neste ciclo três estádios infecciosos: bradizoitos, taquizoítos e esporozoitos. Na gestação, os bradizoitos podem converter-se em taquizoítos, que proliferam assexuadamente, promovendo a infecção fetal (BARR et al., 1991). Sendo assim, os taquizoitos e bradizoitos são os estádios intracelulares encontrados nos HI. Os bradizoitos encontram-se encistados e replicam-se lentamente (DUBEY; BUXON; WOUDA, 2006) e os taquizoítos se dividem muito rapidamente e podem infectar vários tipos celulares, como células do sistema nervoso, do endotélio

vascular, miócitos, hepatócitos, células renais, macrófagos alveolares e também trofoblasto placentário (BARR et al., 1991).

O HD adquire o agente ao ingerir cistos com bradizoítos em restos placentário ou oocistos esporulados que podem estar no ambiente. No intestino deste hospedeiro, ocorre a diferenciação sexual do parasito formando oocistos imaturos que serão excretados em suas fezes. No ambiente, ocorre a esporulação e os oocistos tornam-se infectantes tanto para os carnívoros quanto para os herbívoros (BARR et al., 1991).

A neosporose clínica em ruminantes é manifestada apenas pela ocorrência de abortos recorrentes e falha reprodutiva com repetição de cio. Os abortos ocorrem geralmente no período de 5 a 6 meses de gestação em bovinos. Também pode ocorrer absorção, mumificação e maceração desse feto. Caso sobrevivam, animais podem nascer vivos com sinais clínicos ou nascerem clinicamente normais, mas permanentemente infectados. Bezerros infectados podem apresentar sinais clínicos neurológicos como incapacidade de se levantarem e com baixo peso ao parto (DUBEY; SCHARES, 2011).

Todo o trajeto do parasito até a ocorrência do aborto é muito complexo e parcialmente compreendido. As perdas podem ocorrer após uma infecção primária durante a gestação, mas geralmente ocorre devido uma ativação do parasito presente na forma de cistos nos tecidos. Assim, ocorre a parasitemia atingindo a placenta e posteriormente o feto (DUBEY; BUXON; WOUDA, 2006).

A transmissão do parasito pode ocorrer tanto pela via horizontal quanto pela vertical. A transmissão horizontal se dá quando o bovino ingere oocistos esporulados de *Neospora caninum* presentes no ambiente. Já a vertical (transplacentária), considerada a principal via de manutenção e transmissão do agente dentro de um rebanho, ocorre quando vacas prenhes com infecções persistentes transmitem o agente para a sua prole durante a gestação (DUBEY;

BUXON; WOUDA, 2006). A transmissão transplacentária pode ser dividida em exógena e endógena dependendo de sua origem. A endógena ocorre quando há reativação e conversão de bradizoitos em taquizoitos a partir de cistos teciduais presentes no animal. Já a exógena decorre da infecção pela ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente durante a gestação (TREES; WILLIAMNS, 2005).

Outras formas de transmissão da neosporose têm sido estudadas. Há relatos de que o DNA deste agente foi encontrado em sêmen de animais naturalmente infectados, porém a quantidade foi consideravelmente baixa, de forma que a transmissão venérea, em bovinos, é de pouca importância (ORTEGA-MORA et al., 2003).

Estudos de soroprevalência e de infecção demonstram a distribuição mundial do *Neospora caninum* (DUBEY; SCHARES, 2011). A soroprevalência de bovinos leiteiros pode ser muito elevada, podendo chegar a 100%. Além disso, o parasito em questão é transmitido de forma eficiente das fêmeas infectadas para suas crias. Porém, enquadrar o *N. caninum* como o causador do aborto é complexo, pois há relatos de que o parasito foi visualizado em fetos abortados tendo como a causa de aborto outra etiologia. Logo, um diagnóstico positivo seria aquele em que foi possível observar presença de lesões, taquizoitos no feto e a exclusão de outras possíveis causas de aborto (BARR et al., 1991).

Lesões macroscópicas associadas a neosporose são raras, mas podem ocorrer no coração, músculo esquelético e cérebro. Áreas focais de coloração mais clara podem ser observadas em músculo esquelético e no coração (DUBEY; LINDSAY, 1996). No sistema nervoso, descreve-se a ocorrência de hidrocefalia (DUBEY et al., 1996).

Microscopicamente as lesões associadas ao aborto por *Neospora caninum* são infiltrado inflamatório compostos basicamente por células

mononucleares, que podem ser encontradas em todos os órgãos dos fetos abortados, principalmente SNC, coração e músculo esquelético (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY; LINDSAY, 1996; SANTOS et al., 2011; VARASCHIN et al., 2012), associadas a áreas multifocais de necrose (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; SANTOS et al., 2011; VARASCHIN et al., 2012) e no sistema nervoso a gliose (DUBEY; LINDSAY, 1996; SANTOS et al., 2011; VARASCHIN et al., 2012; WOUDA; DUBEY; JENKINS, 1997).

Logo, a visualização de graves lesões no cérebro e no coração com demonstração de taquizoítos próximos é um forte indício de que a causa de aborto foi o *Neospora caninum*. Porém, a decisão de que as lesões são incompatíveis com a vida do feto é de responsabilidade do examinador. Desta forma, seu conhecimento sobre a neosporose é de grande importância (DUBEY; SCHARES, 2006).

Lesões placentárias também podem estar associadas ao aborto, pois levam a produção e liberação de citocinas inflamatórias ocasionando expulsão do feto. Além disso, essas lesões podem comprometer a oxigenação do feto desencadeando a liberação do hormônio ACTH fetal com posterior estímulo a sua expulsão (DUBEY; BUXON; WOUDA, 2006). Essas lesões placentárias geralmente se limitam ao cotilédone e consistem de áreas focais de necrose e inflamação com presença de taquizoítos no trofoblasto (BARR et al., 1991). Também é possível observar que na base dos placentomas pode ocorrer uma hiperplasticidade, pela presença de células mononucleares. Assim, danos muito graves na placenta, devido à multiplicação primária do agente, podem prejudicar a manutenção do feto (MALEY et al., 2003).

Além da lesão na placenta, o estágio da gestação vai influenciar no destino deste feto. Um feto muito novo não terá condições de desenvolver uma resposta imunológica para controlar a parasitemia. Já um feto mais desenvolvido

terá capacidade de limitar o desenvolvimento de lesões e de cistos em seus tecidos (DUBEY; BUXON; WOUDA, 2006).

Em um estudo realizado por Elsheikha et al. (2013) foi possível observar que o parasito é capaz de crescer e se multiplicar dentro de células endoteliais que compõe os vasos da barreira hemato-encefálica sem interromper, significativamente, no funcionamento normal das células hospedeiras durante as primeiras 24 horas. Acredita-se que o parasito possa modificar o ambiente celular bloqueando a morte celular ou as vias de apoptose, promovendo sua sobrevivência dentro das células. Porém, esse estudo foi realizado com células humanas (HBMEC e K562), não em células de hospedeiros naturais. Logo, podem ocorrer diferenças no mecanismo de sobrevivência do *N. caninum* nas células ou até mesmo na forma de invasão ao sistema nervoso central.

O diagnóstico de neosporose pode ser feito por histopatologia, imuno-histoquímica (DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996; MESQUITA et al., 2013) e pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996; SANTOS et al., 2011). O teste de imuno-histoquímica é um importante método de diagnóstico, pois associa a presença do parasito às lesões teciduais e os evidencia quando há poucos taquizoítos ou cistos teciduais. Nestas situações não são facilmente visualizados em cortes histológicos pelas colorações de rotina, como a hematoxilina e eosina (DUBEY, 2003).

Muitas vezes testes sorológicos são utilizados na detecção de animais portadores do *N. caninum*, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e vários ELISAs, desenvolvidos para o diagnóstico em cães, bovinos e outros animais potencialmente hospedeiros (ATKINSON et al., 2000). É importante salientar que a sorologia detecta somente a infecção, sendo essencial para o diagnóstico definitivo, a realização de necropsia dos fetos e a análise da placenta (DUBEY; BUXON; WOUDA, 2006), seguindo da marcação imuno-histoquímica (DUBEY, 2003;

PESCADOR et al., 2007; VARASCHIN et al., 2012) e provas moleculares (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996; SANTOS et al., 2011).

2.2 Herpesvírus

O Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1), pertencente a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *Varicocelovírus* é um dos principais agentes virais causadores de aborto em bovinos (KUNRATH et al., 2004).

O Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB tipo 1) pode ser dividido em três diferentes genótipos: 1 (BoHV-1.1), 2a (BoHV-1.2a) e 2b (BoHV-1.2b) podendo causar várias complicações. Assim, o BoHV-1.1 está associado às doenças respiratórias como Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (RIB) e a casos de aborto. O BoHV-1.2a está associado a manifestações clínicas do trato genital, como a Vulvovaginite Pustular Infecciosa (VPI), Balanopostite Pustular Infecciosa (BPI), aborto e também a infecções do trato respiratório. Já, o BoHV-1.2b, incomum no Brasil, tem sido associado com doença respiratória leve e VPI/BPI, mas até então, não há associação deste genótipo com casos de aborto (FRANCO; ROECHE, 2007).

Desta forma, tanto a forma respiratória, quanto a genital do herpesvírus bovino tipo-1 podem provocar a morte fetal e aborto. Touros com lesão no pênis (balanopostite) apresentam um papel importante na transmissão. Além disso, a inseminação artificial em fêmeas sadias, com sêmen contaminado, pode causar um elevado número de infecção (JARRETI et al., 1984).

Outra espécie viral distinta é o Herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5) que está associado aos casos fatais de meningoencefalite em bovinos jovens (OLDONI et al., 2004). Segundo Oldoni et al. (2004), o HVB-5 é geneticamente e antígenicamente relacionado com o HVB-1, entretanto, algumas diferenças

antigênicas tem sido detectadas entre as glicoproteínas de envelope destes vírus (glicoproteína C). Apesar dessas diferenças, técnicas sorológicas tradicionais e a maioria dos anticorpos monoclonais para HVB-1 e HVB-5 são incapazes de distinguir entre estes dois vírus.

Uma característica importante para todos os herpesvírus é a sua capacidade de permanecer latente, persistindo indefinidamente em seu hospedeiro após uma primeira infecção. Os locais de latência estão associados ao tipo de herpesvírus nos vários animais, sendo que na subfamília *Alphaherpesvirinae* a latência ocorre nos gânglios (THIRE; DUBUISSON; PASTORET, 1986). Durante o período de latência não são sintetizadas proteínas virais, podendo ocorrer o decréscimo no título de anticorpos neutralizantes (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982). Na reativação, o HVB-1 é transportado, via nervos, a partir dos gânglios periféricos para o foco primário da infecção, onde ocorre a replicação e eliminação viral (DENNET; BARASA; JOHNSON, 1976).

Em animais prenhes quando o vírus entra em contato com a mucosa respiratória ou do trato genital, ocorre sua multiplicação e disseminação, por meio de leucócitos infectados, para todo o corpo do animal podendo chegar ao útero. Foi postulado que ao atingir a carúncula, o vírus passa do trofoblasto para o interstício da vilosidade. Na sequência, infecta o endotélio, e mesenquima (SCHLAFER; MILLER, 2007b). Desta forma, o aborto pode ocorrer tanto pela exposição inicial ao vírus, pela reativação de vírus latente, quanto pela vacinação de vacas prenhes usando vírus vacinal vivo (CROOK et al., 2012).

O índice de aborto pelo HVB tipo 1, pode chegar a 25% no rebanho. A morte fetal ocorre por lesões necróticas disseminadas tanto no feto quanto na placenta, provocando extensas lesões vasculares, pulmonares, hepáticas e no sistema nervoso. O aborto ocorre cerca de 3 a 6 semanas após a infecção e a

expulsão do feto por volta de 3 a 5 dias, apresentando elevado estado de autólise (WOUTERS, 2006).

As lesões macroscópicas geralmente estão ausentes ou mascaradas pela autólise, mas quando visíveis, incluem focos brancos de 1-3 mm sob a cápsula do fígado e mais raramente sob a superfície do pulmão. Também podem ser observadas hemorragias peri-renais e focos de hemorragias na junção corticomedular do rim (SCHLAFER; MILLER, 2007b).

As lesões microscópicas encontradas nos fetos são áreas de necrose em vários tecidos, mas são mais evidentes no fígado (CROOK et al., 2012; KENNEDY; RICHARDS, 1964). Em estudos experimentais, as áreas de necrose do fígado estavam disseminadas por todo o parênquima e consistiam de focos circulares de 2-5 mm de diâmetro que se iniciavam com aglomerados de fragmentos nucleares. Infiltrado inflamatório leucocitário, composto principalmente por neutrófilos, pode ser observado inicialmente na periferia da necrose e posteriormente concentrar-se ao longo dela. Normalmente esses neutrófilos se degeneram e, com o desenvolver da lesão, são mais difíceis de serem identificados. Além disso, também pode ocorrer uma proliferação de reticulócitos na região portal do fígado (KENNEDY; RICHARDS, 1964). Infiltrado de linfócitos e plasmócitos circundando as áreas de necrose também são descritos (CROOK et al., 2012). Focos de necrose também podem ser visualizados no baço, timo (KENNEDY; RICHARDS, 1964), linfonodos (ANTONIASSI et al., 2007; KENNEDY; RICHARDS, 1964) rim, placenta (ANTONIASSI et al., 2007) e pulmão (ANTONIASSI et al., 2007; CROOK et al., 2012). Lesões placentárias nem sempre estão presentes (CROOK et al., 2012), porém pode ocorrer necrose das vilosidades fetais associada a um discreto infiltrado inflamatório neutrofílico, edema da túnica média dos pequenos vasos sanguíneos da placenta, necrose e descamação das células endoteliais (CROOK et al., 2012; RODGER et al., 2007).

Nos distúrbios reprodutivos ocasionados pelo HVB-1 o diagnóstico clínico é praticamente impossível, devendo ser diferenciado de outras causas infecciosas e não infecciosas.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HVB-1 pode ser realizado por técnicas sorológicas (detecção de anticorpos específicos) como a soroneutralização e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Porém, não é possível a detecção de animais portadores do vírus em latência por meio de métodos sorológicos tradicionais, pois estes animais podem apresentar baixos títulos de anticorpos. Essas técnicas também são incapazes de diferenciar os títulos provenientes da exposição ao vírus vacinal daqueles oriundos da exposição natural ao vírus de campo (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Técnicas mais específicas têm sido utilizadas, como a técnica de PCR que possibilita a detecção de partículas virais não infectantes no exame ante-mortem (HAYDEN et al., 1991).

A imuno-histoquímica também é uma ferramenta utilizada, como método diagnóstico, principalmente quando tecidos fetais estão disponíveis (KIRKBRIDE, 1992). A marcação imuno-histoquímica é descrita em áreas de necrose do fígado e pulmão, mas também em áreas sem lesão, como o cérebro, vasos da placenta e parede alveolar (CROOK et al., 2012). Mais recentemente, a partir de antígenos virais isolados de amostras de HVB-5 do Brasil, Oldoni et al. (2004) desenvolveram anticorpos monoclonais para marcação imuno-histoquímica que reagem especificamente com HVB-5 e alguns com marcação cruzada para HVB-1 como, por exemplo, os clones 4E4, tornando-se uma importante ferramenta para o diagnóstico de aborto por herpesvírus bovino.

2.3 Vírus da Diarreia Viral Bovina

A Diarreia Viral Bovina (DVB) tem como agente etiológico um vírus RNA envelopado pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*, podendo atingir o animal em qualquer fase de sua vida (VANROOSE, 2000).

Existem dois biótipos do agente, os citopatogênicos (CP) e os não citopatogênicos (NCP). Essa divisão é de acordo com a capacidade de causarem ou não, morte celular *in vitro*. As amostras NCP são as mais frequentemente isoladas a campo e são responsáveis por diarreia bovina (RIET-CORREA et al., 2007) e também possuem a capacidade de atravessar a placenta acometendo o feto (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000). Ambos os vírus NCP e CP podem ser divididos em dois genótipos: 1 e 2 (DONIS, 1995).

O Vírus da Diarreia Viral Bovina (VDVB) é um dos principais patógenos do sistema reprodutivo de bovinos em todo o mundo, com uma incidência de infecção geralmente acima de 70% (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000).

O animal infectado com o vírus da DVB se torna transitoriamente ou persistentemente infectado. Os transitoriamente infectados podem desenvolver uma resposta imune (RÜFENACH et al., 2001). Já, os persistentemente infectados (PI), são aqueles que reconhecem as partículas virais como próprias e, se expostos a uma cepa imunologicamente idêntica, porém do biótipo citopatogênica, desenvolvem a forma fatal da doença, chamada de doença das mucosas (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000). Um animal PI é aquele em que o vírus da DVB tenha sido isolado de leucócitos periféricos ou soro, em duas diferentes ocasiões, com pelo menos três semanas de intervalo (BRODERSEN, 2004). Esses animais são de grande importância para a epidemiologia da doença porque eliminam grande quantidade de vírus e servem de fonte constante de infecção para os animais ainda saudáveis (RÜFENACH et al., 2001).

Apesar do VDVB, estar mais frequentemente associado com a população bovina, a infecção de uma variedade de biungulados domésticos e exóticos tem sido relatada (BACHOFEN et al., 2013; FRAY; PATON; ALENIUS, 2000; NELSON et al., 2008). De acordo com Bachofen et al. (2013) o contato de cabras prenhes com bovinos persistentemente infectados (PI) pode gerar caprinos PI. Logo o contacto destes caprinos PI com outras cabras prenhes pode gerar uma nova geração de caprinos PI.

No Brasil, vários isolados do vírus já foram caracterizados geneticamente e/ou antigenicamente e, um número significativo de amostras está aguardando sua caracterização. A maioria dos isolados já caracterizados pertence ao genótipo VDVB-1 e ao biótipo não-citopatogênico (NCP), embora vários isolados de VDVB-2 (alguns citopatogênicos) já tenham sido identificados. Os isolados brasileiros apresentam grande variabilidade antigênica entre si e entre cepas vacinais norte-americanas (FLORES et al., 2005).

A infecção pelo vírus da DVB está associada a várias formas de manifestação clínica, incluindo a diarreia viral, doença das mucosas, doença do complexo respiratório bovino, aborto, síndrome do bezerro fraco, efeitos teratogênicos no feto, e infecção hiperaguda com alta morbidade e mortalidade (BASZLER et al., 1995). Mais recentemente uma síndrome chamada de pancitopenia neonatal bovina, que cursa com trombocitopenia e marcada destruição da medula óssea em bezerros, foi amplamente descrita na Europa, a partir de 2007, e na Nova Zelândia desde 2011. A doença é epidemiologicamente associada ao uso de uma vacina inativada do vírus da DVB. Considera-se a hipótese que aloanticorpos (*ii*) maternos, absorvidos via colostro, de algumas vacas vacinadas levem à destruição de células da medula óssea de bezerros (LAMING et al., 2012).

Além da transmissão via animais PI, o vírus também é transmitido por animais agudamente infectados, fômites, soro bovino, material usado em exame

retal, fluidos da transferência de embriões, vacinas (ENTRICAN, 2002; FRAY; PATON; ALENIUS, 2000) e sêmen contaminados (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000; VANROOSE, 2000).

Em um estudo experimental, cuja avaliação foi da sensibilidade do embrião em relação ao vírus, foi feita a exposição do embrião com a zona pelúcida intacta e eclodida em contato com o vírus. Observou-se que aqueles embriões, cuja zona pelúcida encontrava-se intacta, não apresentaram nenhuma alteração embrionária. Já os que possuíam zona pelúcida eclodida, apresentaram lesões citopáticas culminando na morte embrionária. Além da destruição celular embrionária, o vírus também replica em células do oviduto levando a lise celular. Desta forma há prejuízo na produção de fatores favoráveis ao desenvolvimento do embrião (VANROOSE; KRUIF; SOOM, 2000).

O feto é vulnerável a infecção quando animais susceptíveis entram em contacto com o VDVB. De uma forma geral, a infecção transplacentária é particularmente perigosa, durante os primeiros 180 dias de gestação, o que pode resultar em aborto, fetos mumificados, malformações congênitas, ou o nascimento de bezerras PI (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000).

Embora o vírus da DVB seja bastante difundido no Brasil, não é possível saber a real situação epidemiológica desta doença, pois, um pequeno número de laboratórios realiza o diagnóstico da infecção e também há baixa identificação dos casos por veterinários e proprietários (RIET-CORREA et al., 2007). Relatos internacionais descrevem que na Suíça, 7% dos abortos dos animais foram causados pelo VDVB (RÜFENACH et al., 2001). Já na Suécia, a porcentagem de aborto em alguns rebanhos pode chegar a 42% (BJÖRKMAN et al., 2000). Em outro estudo realizado na República da Croácia foi observado que, em uma alta porcentagem de vacas com distúrbio reprodutivos, 80,8% desses problemas eram decorrentes da presença de infecção simultânea de IBR e DVB (BIUK-RUDAN et al., 1999). Em muitos rebanhos, as malformações são

os únicos achados que sugerem a presença do vírus da DVB (KRIKBRIDE, 1992).

Assim, a identificação e eliminação dos persistentemente infectados juntamente com medidas de biossegurança no rebanho ajudam a evitar a introdução e a permanência do agente no rebanho (GROOMS, 2006).

As lesões em fetos, causadas pelo VDVB, são inespecíficas. Podem ocorrer infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar e interalveolar (MURRAY, 1991) além de miocardite não específica. Animais afetados no segundo trimestre da gestação podem apresentar má formações congênicas como hipoplasia de cerebelo, catarata, hipoplasia de timo, hidrocefalia, bragnatia, hipoplasia pulmonar e anormalidades ósseas (GROOMS; BAKER; AMES, 2002).

O diagnóstico de DVB pode ser feito pela demonstração de antígenos virais em tecidos (fetos abortados, placentomas, fragmentos de tecidos coletados na necropsia) por meio da técnica de imuno-histoquímica (IHQ), assim como imunofluorescência e PCR (ANTONIASSI et al., 2007). A IHQ também tem sido amplamente utilizada para a identificação de animais PI a partir de biópsias de pele (BRODERSEN, 2004). A maioria dos anticorpos monoclonais testados na IHQ não detecta antígenos do vírus da DVB em tecidos fixados em formol e embebidos na parafina. O anticorpo monoclonal 15C5 reage com a proteína EO (gp48) do VDVB. O gene codificador de EO tem uma alta homologia entre as sequências de pestivírus, sendo assim o EO um alvo apropriado para sistemas de detecção de uma ampla variedade de isolados (SILVA et al., 1994 apud BRODERSON, 2004).

Alguns trabalhos descrevem que em animais infectados agudamente com o vírus da DVB ou em animais vacinados com vacina viva para DVB, a detecção de antígenos virais pela IHQ em biópsias de pele é muito baixa. A imunomarcagem na pele de bovinos PI é descrita na epiderme e anexos da pele

(principalmente no infundíbulo do folículo piloso e em menor quantidade no bulbo), células dendríticas da derme e ocasionalmente nos condrócitos da cartilagem da orelha. Porém, algumas vezes a distribuição dos antígenos na pele não é tão ampla, podendo dificultar o diagnóstico (BRODERSEN, 2004). Mas, quando o anticorpo monoclonal 15C5 foi utilizado na marcação do trato gastrointestinal de animais com doença respiratória primária, cujo isolamento viral foi confirmado, a marcação IHQ ocorreu em 100% das amostras (BASZLER et al., 1995).

Em abortos causados pelo VDVB, os antígenos virais foram identificados no citoplasma de células mononucleares no interstício pulmonar e no epitélio bronquiolar (semelhante ao encontrado em bovinos adultos com pneumonia intersticial), nas células de Kupffer e monócitos circulantes do fígado, células epiteliais tubulares dos rins (túbulos medulares e ductos coletores), neurônios, células do córtex da adrenal e células mononucleares da polpa vermelha do baço. De uma forma geral, os antígenos do VDVB localizados nos tecidos fetais, não estavam associados com lesões histopatológicas (BASZLER et al., 1995). Outros estudos realizados em fetos detectaram a marcação IHQ em diferentes tecidos, como monócitos e células endoteliais dos sinusoides hepático, dos rins, coração e lâmina própria do intestino delgado, células mesangiais dos glomérulos, cardiomiócitos (NELSON et al., 2008), células epiteliais do folículo piloso, citoplasma dos osteoblastos e osteoclastos (BACHOFEN et al., 2013). Assim, a imunomarcação em tecidos pode apresentar-se variada, sendo recomendada a sua realização em vários tecidos.

2.4 Brucelose

A Brucelose é uma zoonose causada por bactérias intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella* (ACHA; SZYFRES, 2001). Estas são bactérias Gram negativas, aeróbias, cocobacilos (coco bacilos), imóveis e não formadoras de esporos (CARVALHO NETA et al., 2010). A *Brucella* spp, foi isolada pela primeira vez em humanos no ano de 1887 na cidade de Malta a partir do baço de soldados, por isso ficou conhecida como febre ondulante ou febre de Malta (BARGEN et al., 2012).

Até o presente momento, dez espécies do gênero *Brucella* foram reconhecidas, com sua nomenclatura baseada principalmente nos seus hospedeiros preferenciais (BARGEN et al., 2012), sendo a *Brucella abortus* a responsável pela brucelose bovina (ALMEIDA; SANTORELLI; BRUZADELLI, 2004).

Os surtos de brucelose bovina estão associados a abortos durante o ultimo trimestre da gestação, nascimento de bezerros fracos e infertilidade de vacas e touros (ENRIGHT et al., 1984). A via mais comum de infecção por *B. abortus* é o trato gastrointestinal (KENNEDY; MILLER, 1993). Pastos, cochos de alimentos e águas contaminadas pelas secreções, membranas fetais e fetos abortados são considerados os principais meios de disseminação (RADOSTISTS; BLOOD; GAY, 1994). Outras formas menos importantes de transmissão aos bezerros é pelo leite contaminado (NICOLETE, 1980) e pela via vertical (CARVALHO NETA et al., 2010). Sob condições naturais a transmissão venérea não é uma rota importante de infecção, mas a inseminação artificial com sêmen contaminado é uma fonte considerável de infecção (CARVALHO NETA et al., 2010).

Após a ingestão, as bactérias são endocitadas pelas células epiteliais do intestino delgado, particularmente as células M das placas de Peyer (SILVA et

al., 2005). Inicialmente se alojam nos linfonodos regionais, onde proliferam no interior de fagócitos (KENNEDY; MILLER, 1993; SILVA et al., 2005) levando ao aumento de volume destes por causa da hiperplasia e linfadenite aguda (KENNEDY; MILLER, 1993). A invasão dos vasos linfáticos e a bacteremia subsequentes permitem a disseminação da infecção por todo o organismo e, conseqüentemente, a colonização de vários tecidos, especialmente os testículos, útero gestante e glândula mamária. A *B. abortus* também pode ser encontrada no baço, fígado, linfonodos, ossos e articulações (KENNEDY; MILLER, 1993). Este agente tem um forte tropismo pelo útero no último trimestre da gestação, pensa-se que seja devido às altas concentrações de eritritol. Este composto favorece a sobrevivência da bactéria já que ela é capaz de metabolizá-la como fonte de carbono e energia (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993).

Células trofoblásticas eritrofagocíticas localizadas na base de vilosidades coriônicas dos ruminantes são consideradas o principal local de invasão dos tecidos fetais de onde a *B. abortus* é capaz de se disseminar para a região do trofoblasto intercotiledonário. Essa multiplicação pode levar a formação de infiltrado inflamatório, necrose trofoblástica, vasculite e ulceração do corioamniótico. Desta forma, as trocas materno-fetal se tornam comprometidas ocasionando o aborto (ANDERSON; MEADOR; CHEVILLE, 1986).

A sobrevivência intracelular da *B. abortus* depende de sua habilidade de resistir ao ambiente intra-fagossômico acidificado e de inibir a fusão fagossomo-lisossomo. *B. abortus* transita do compartimento fagossômico em direção ao retículo endoplasmático rugoso (RER) da célula hospedeira, onde a bactéria tem um ótimo microambiente para a replicação (CARVALHO NETA et al., 2010). A explicação para a replicação dentro do RER é que a *Brucella* usa novas proteínas sintetizadas produzidas no RER hipertrofiado (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993).

Após o primeiro episódio de aborto por *Brucella*, a vaca acometida tem muitas vezes, partos normais, mas outros abortos podem voltar a ocorrer (NICOLETTI, 1980).

Bezerros que adquirem a bactéria por ingestão de leite contaminado ou por via vertical podem permanecer sorologicamente negativos e não apresentar qualquer sintomatologia. Porém, novilhas assintomáticas podem abortar ou dar a luz a bezerros fracos que se tornam o centro da manutenção da doença no rebanho (NICOLETTI, 1980). Geralmente as vacas prenhes desenvolvem uma linfadenopatia no local da infecção que pode ser seguida de uma linfadenite aguda (SCHLAFER; MILLER, 2007a).

Lesões macroscópicas podem ser observadas na placenta, no útero gravídico e raramente em fetos, mesmo assim, essas lesões não são sugestivas da doença. Na placenta ocorre necrose de cotilédones e edema na área intercotiledonária (SCHLAFER; MILLER, 2007a). Lesões placentárias podem estar distribuídas aleatoriamente entre placentomas de forma que podem coexistir placentomas normais e outros com necrose grave e hemorragia. Microscopicamente, a lesão mais frequente é a placentite necrótica, caracterizada por necrose superficial ou profunda das carúnculas, associada à hemorragia, exsudato neutrofílico e colônias bacterianas intralesionais. O útero de animais prenhes infectados pode apresentar uma quantidade variável de exsudato fétido de coloração amarelo acastanhado tendo, ou não, fibrina e restos celulares (XAVIER, 2009).

No feto o pulmão é o órgão mais frequentemente afetado (XAVIER, 2009), podendo ocorrer pequenas áreas esbranquiçadas (PLOMMET et al., 1988). A pleura pode apresentar-se edemaciada, espessa, hemorrágica e recoberta por fibrina caracterizando uma pleurite fibrinosa, sem necessariamente ocorrer o envolvimento do parênquima pulmonar (XAVIER, 2009). O pulmão também pode apresentar-se com aumento de consistência e espessamento de

septos interlobulares. Inflamações fibrinosas também podem ocorrer no pericárdio e peritônio (CARVALHO NETA et al., 2010).

Microscopicamente observa-se pleurite fibrinosa, bronquite (CARVALHO NETA et al., 2010; ENRIGHT; SAMARTINO, 1994; XAVIER, 2009), broncopneumonia supurativa, com acúmulo de macrófagos e neutrófilos (CARVALHO NETA et al., 2010; ENRIGHT; SAMARTINO, 1994; PÉREZ et al., 1998; XAVIER, 2009), pneumonia intersticial (CARVALHO NETA et al., 2010; PÉREZ et al., 1998), trombose e arterite (artrite) necrosante em vasos do pulmão. Podem ser visualizados focos de necrose e formação de granulomas nos linfonodos, baço, rim (ENRIGHT; SAMARTINO, 1994) e fígado (ENRIGHT; SAMARTINO, 1994; PÉREZ et al., 1998). Nas áreas de pleurite fibrinosa e broncopneumonia, pode haver quantidades variáveis de fibrina, hemorragia e bactérias (XAVIER, 2009). Pode ser observada, ainda, hiperplasia linfoide dos linfonodos e do baço enquanto que no timo é possível observar uma depleção linfoide (ENRIGHT et al., 1984). Meningite multifocal ou difusa ocorre menos frequentemente. Esta é caracterizada por infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e pouca quantidade de neutrófilos, associados à vasculite (HONG et al., 1991).

Dentre os métodos utilizados para o diagnóstico de aborto brucélico, a imuno-histoquímica demonstrou ser uma técnica sensível. A imunomarcagem ocorre em bactérias presentes no citoplasma de grandes macrófagos espumosos e em alguns neutrófilos, bem como em restos celulares que estavam nos alvéolos e brônquios. No fígado esta ocorre em citoplasma de macrófagos isolados do infiltrado periportal (PÉREZ et al., 1998). Bactérias também podem ser evidenciadas pela IHQ dentro de macrófagos das meninges e plexo coróide de fetos acometidos pela brucelose (HONG et al., 1991). A imunomarcagem também pode ocorrer nas carúnculas e endométrio de vacas com placentite,

sendo a bactéria observada tanto nas áreas de necrose como no citoplasma de macrófagos, neutrófilos e células trofoblásticas (XAVIER, 2009).

Segundo Santos et al. (1998), a imuno-histoquímica tem sido empregada como técnica de diagnóstico em tecidos de fetos abortados, tendo a vantagem de não necessitar que a bactéria esteja viável no tecido.

2.5 Leptospirose

A leptospirose é uma doença bacteriana de ocorrência mundial, que pode acometer várias espécies de mamíferos, incluindo o homem. Esta bactéria também tem sido isolada de pássaros, répteis, anfíbios e artrópodes (SZEREDI; HAAKE, 2006). Sua ocorrência é maior em países de clima tropical e subtropical. Nestes locais sua maior incidência ocorre nos períodos de chuva, pois a *Leptospira* sobrevive melhor em ambientes úmidos (OLIVEIRA et al., 2010).

O agente é uma espiroqueta da espécie *Leptospira interrogans*. Esta espécie apresenta mais de 212 sorovares que podem ser agrupados em 23 sorogrupos (ELLIS, 1994). Nos animais de produção é um importante agente associado à perdas reprodutivas devido ao aborto, natimortos, infertilidade, e perdas não reprodutivas devido a casos de septicemia e nefrite (GROOMS, 2006). Nos bovinos é considerada uma importante causa de aborto bacteriano e a infecção ocorre mais frequentemente pela *Leptospira interrogans*, sorovar *pomona* e sorovar *hardjo* (ANTONIASSI et al., 2007).

Estudos de soroprevalência realizados em bovinos de diversas regiões do mundo descrevem uma variabilidade na distribuição de sorovar de leptospirosas patogênicas. No Brasil, em bovinos de leite, descreve-se uma maior soropositividade para os sorovares *hardjo* (AGUIAR et al., 2006; CAVAZINI et al., 2008; LANGONI, 1999; OLIVEIRA et al., 2010; VASCONCELLOS et al.,

1997), *bratislava* (LANGONI, 1999), *icterohaemorrhagiae* (CAVAZINI et al., 2008), *pomona*, *wolffi*, *grippotyphosa* (AGUIAR et al., 2006; CAVAZINI et al., 2008; VASCONCELLOS et al., 1997), *australis* (CAVAZINI et al., 2008; VASCONCELLOS et al., 1997), *canicola*, *catelloni*, *bratislava*, *tarassovi* e *butembo* (CAVAZINI et al., 2008), entre outras. Essa soroprevalência pode variar conforme a região estudada, mas a sorovar *hardjo* tem sido mais prevalente em vários estudos, sendo o maior responsável pela infertilidade bovina (AGUIAR et al., 2006; CAVAZINI et al., 2008; ELLIS, 1994; GROOMS, 2006; LANGONI, 1999; OLIVEIRA et al., 2010; VASCONCELLOS et al., 1997).

A leptospirose tipicamente ocorre após a exposição das membranas mucosas à bactéria e geralmente resulta numa manifestação clínica suave ou ausente. Após a primeira bacteremia, a *Leptospira* localiza-se e persiste nos rins e no trato reprodutor. O agente localizado nos rins é eliminado na urina e serve de fonte de infecção para outros animais. A persistência da *Leptospira* no sistema reprodutor feminino e masculino pode perdurar por aproximadamente 12 meses para a sorovar *hardjo* (GROOMS, 2006).

Bovinos com leptospirose podem manifestar vários sinais clínicos como aborto, natimortos, nascimento de bezerros fracos, diminuição da produção de leite, infertilidade e morte (GROOMS, 2006; SUEPAUL et al., 2011). O aborto geralmente ocorre no último trimestre de gestação, após uma fase de septicemia (GROOMS, 2006).

No Brasil, no estado da Bahia, foi apontada como fatores de risco a presença de cervídeos, compra de reprodutores, abate de reprodutores dentro da própria fazenda e utilização de pasto compartilhado (OLIVEIRA et al., 2010). Já em Trindade animais com mais de um ano de idade tiveram uma soroprevalência significativamente maior que bovinos jovens. Isso pode ser devido a práticas diferentes de manejo, que aumentariam a susceptibilidade de infecção pelos

animais mais velhos (SUEPAUL et al., 2011). Para Ellis, O'Brien e Cassells (1981), a alta incidência de vacas leiteiras afetadas se deve também ao manejo que propicia uma grande proximidade de animais, onde indivíduos pastadores, que abrigam as leptospiras nos túbulos renais, as eliminam no ambiente por meio na urina por longos períodos de tempo.

Macroscopicamente, geralmente, a principal lesão na placenta é o edema. Já nos fetos, a maioria apresenta grau avançado de autólise, sem que se observem alterações específicas (RIET-CORREA et al., 2007). Porém, em alguns animais, pode ocorrer icterícia leve a moderada, aumento de volume do fígado, baço e linfonodos mediastínicos. O fígado pode apresentar-se amarelado, friável e com pontos cinza-esbranquiçados (SZEREDI; HAAKE, 2006). Animais nascidos fracos ou natimortos podem apresentar também icterícia, fígado pálido ou amarelado, rins edemaciados com manchas esbranquiçadas na superfície (RIET-CORREA et al., 2007).

Microscopicamente é possível observar túbulos renais distendidos com suave a severa tubulonefrose, vasculite, perivasculite, nefrite intersticial linfocítica (histiocística) e hemorragia aguda. No fígado, pode notar-se necrose multifocal, infiltrado de linfócitos, histiócitos e neutrófilos no parênquima e tríades portal, degeneração vacuolar dos hepatócitos e colestase. Menos frequentemente, há proliferação de ductos biliares. No pulmão, pode ocorrer vasculite linfocitária e trombose nos vasos sanguíneos. Vasculite discreta no coração, baço, e cérebro. Lesões nas membranas fetais como vasculite linfocitária, edema e hemorragias podem estar presentes (SZEREDI; HAAKE, 2006).

Para o diagnóstico ante mortem, é necessário considerar os achados sorológicos, sendo que animais positivos são os que apresentam títulos acima de 400, para sorovar *hardjo*, e 800 para *pomona* (RIET-CORREA et al., 2007). Na avaliação de tecidos, colorações especiais como Warthin-Starry podem ser

utilizadas para demonstrar as leptospiras no citoplasma de células do epitélio coriônico, endoteliais, epitélio tubular renal e extracelularmente no lúmen dos túbulos renais dos vasos sanguíneos em vários tecidos fetais e placenta. Mas, muitos tecidos podem não ser positivos nas colorações pela prata. Além disso, o diagnóstico de leptospirose nas técnicas pela impregnação de prata pode ser feito somente na presença das formas longas das espiroquetas espiraladas. Logo, as outras formas da leptospira (curtas e arredondadas, agregados, ou formas cocóides) não são detectadas pelas colorações de prata, uma vez que estas são indistinguíveis dos artefatos (SZEREDI; HAAKE, 2006). A dificuldade de diagnóstico com esse método é devido à extensa coloração da reticulina e a incapacidade de se reconhecer fragmentos da leptospira, especialmente se poucos organismos estiverem presentes (WILD et al., 2002).

A imuno-histoquímica tem sido utilizada para a detecção de *Leptospira* com grande eficiência em várias espécies animais, como porcos, abster, bovinos (SZEREDI; HAAKE, 2006), cães (WILD et al., 2002) e eqüinos. Os antígenos são demonstrados numa variedade de tecidos, sendo mais abundante no fígado, coração, pulmão e rins. É observada uma típica forma espiralada da leptospira, como pequenos cocos e na forma de grandes grânulos extracelulares e intracelulares (SZEREDI; HAAKE, 2006).

2.6 Listeriose

O agente causador da listeriose em ruminantes é a *Listeria monocytogenes*. Uma bactéria saprófita, Gram positiva, frequentemente encontrada no ambiente (FAIRLEY; CHOLLUM; BLACKMORE, 1984). Quando ingerida pode causar uma doença grave com ocorrência de septicêmica e altas taxas de mortalidade (ORDORFF et al., 2006).

Após o isolamento inicial e descrição em 1926, a *Listeria monocytogenes* tem se mostrado presente em vários países causando doença grave em uma ampla variedade de animais, incluindo o homem. Primeiramente era conhecida como uma doença somente de animais que ingeriam silagem de má qualidade. Porém, em meados dos anos 80, passou a ganhar maior importância, quando ocorreram os primeiros relatos de infecção em humanos (LOW; DONACHIE, 1997).

A maioria dos casos de listeriose ocorre por ingestão de algum alimento contaminado, mas detalhes da epidemiologia e patologia da doença ainda necessitam de esclarecimento. Sabe-se que o agente possui a capacidade de escapar da morte intracelular em macrófagos por lise da membrana fagolisossômica, indo diretamente para o citoplasma das células (LOW; DONACHIE, 1997). Assim, pode causar graves doenças incluindo o aborto, meningite, septicemia e meningoencefalite (BRANKA; DUBRAVKA; BUGARSKI, 2006).

O agente *Listeria monocytogenes* é responsável por abortamento esporádico em bovinos, ovinos, caprinos e também em surtos nos ovinos. O aborto ocorre no último trimestre da gestação e algumas fêmeas podem apresentar endometrite e septicemia. Os fetos apresentam-se edematosos e autolisados (KENNEDY; MILLER, 1993).

Microscopicamente, na placenta, é possível observar uma inflamação severa no mesênquima das vilosidades e da porção superior do córion intercotiledonário. No trofoblasto, principalmente entre as vilosidades, encontra-se grande quantidade de bacilos de *Listeria* (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). No feto ocorrem focos de necrose miliar no fígado, baço, pulmões, endocárdio e miocárdio. Também é descrita colite necrotizante acentuada, com presença da bactéria nas lesões. Em fetos próximos ao final da gestação, pode ocorrer uma

meningite cérebro-espinhal não supurativa difusa acentuada com a presença do microrganismo (KENNEDY; MILLER, 1993).

Para o diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e microbiológico do aborto por listeria, o material coletado deve ser, preferencialmente, fígado, baço, pulmão e encéfalo (principalmente tronco encefálico) do feto, sendo o material armazenado em formol 10% tamponado e parte congelada (VARASCHIN; WOUTERS, 2006).

Em estudos de listeriose cerebral em caprinos, conduzidos por Rissi et al. (2006), utilizou-se para imuno-histoquímica o anticorpo primário policlonal anti-antígeno celular de *Listeria* spp na diluição de 1:1000. Em geral as bactérias são visualizadas na área dos microabscessos, no citoplasma de neutrófilos e macrófagos, em neurônios normais e degenerados. A imuno-histoquímica foi descrita como o método mais sensível para o diagnóstico da listeriose quando comparado com o cultivo bacteriológico e a coloração de Gram (LOEB, 2004; RISSI et al., 2006).

2.7 Campilobacteriose

Campylobacter fetus subsp. *veneralis* é o principal agente causador da campilobacteriose venérea bovina. Este agente é altamente adaptado ao trato reprodutor de bovinos. Mas o *C. jejuni*, pode também causar abortos e infertilidade.

O agente da campilobacteriose está relacionado à baixa fertilidade, mortalidade embrionária, aborto, retorno ao cio, redução da taxa de prenhes e ao aumento do intervalo entre partos. O seu primeiro relato ocorreu em 1956 quando foi isolada do conteúdo estomacal de um aborto (MSHELIA et al., 2010).

No Brasil, a campilobacteriose provavelmente está presente em todos os estados devido ao manejo reprodutivo realizado no país em que, boa parte dos animais, passa pela monta natural. Isso ocorre porque a transmissão do *Campylobacter* se dá por via sexual, via sêmen contaminado e por comportamento homossexual de touros (ALVES et al., 2011). Também pode ocorrer a transmissão entre touros pelo contato com cama contaminada. Mais raramente, o organismo pode sobreviver na cérvix durante toda a gestação (GIVENS, 2006).

Os problemas de infertilidade e aborto por este agente são bem conhecidos, mas há muito para ser entendido da epidemiologia e distribuição mundial. O abortamento ocorre em forma de surtos, sendo que, o agente causa infecção uterina e liberação do feto na fase final da gestação ou pode levar ao nascimento de animais vivos, mas doentes (MSHELIA et al., 2010). Geralmente os abortos causados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* ocorre entre o quarto e oitavo mês de gestação (GIVENS, 2006).

Macroscopicamente, observa-se na placenta a ocorrência de uma placentite, caracterizada por edemaciação do corioalantoide intercotiledonário, cotilédones friáveis e de coloração amarelada (MCGAVIN; ZACHARY, 2007).

Microscopicamente ocorre, na região corioalantoide, um infiltrado inflamatório de diferentes tipos celulares. A inflamação na região das vilosidades coriônicas é particularmente severa. O *Campylobacter* está presente de forma abundante entre as células inflamatórias. Uma lesão característica é a presença de grandes e densos êmbolos de bactérias nos capilares das vilosidades (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). Em um estudo realizado por Campero et al. (2003), na Argentina, o *Campylobacter* estava entre as principais bactérias causadoras de aborto e os fetos apresentaram como lesões, pneumonias supurativas, pericardite fibrinosa e hepatite necrotizante multifocal.

Quando o histórico do rebanho revela casos de infertilidade, a campilobacteriose deve ser uma das principais suspeitas. Esmegma prepucial, sêmen, fluido fetal, placenta e descargas vaginais podem ser úteis para o diagnóstico definitivo. Assim, essas amostras devem ser enviadas em meio de transporte anaeróbico enriquecido (GIVENS, 2006). A técnica utilizada para diagnóstico de rotina são métodos diretos, sendo que o principal é isolamento e identificação do agente (ALVES et al., 2011).

O diagnóstico imuno-histoquímico tem sido realizado. Morrel et al. (2011) descreveu que a imuno-histoquímica permitiu a detecção do organismo na maioria das lesões relacionadas com a infecção por *C. fetus*. Neste estudo, a IHC teve maior sensibilidade do que PCR em amostras de pulmão. Mas a PCR apresentou maior sensibilidade e especificidade quando a amostra utilizada, para diagnóstico, foi fluido abomasal.

Portanto, a IHQ pode ser útil no estabelecimento de um diagnóstico de campilobacteriose nos casos de aborto em que os resultados da cultura não estão disponíveis. Normalmente, *C. fetus* pode ser isolado com sucesso do conteúdo abomasal em fetos frescos, pois há uma grande quantidade de organismos presentes. No entanto, quando o feto abortado estiver autolisado ou congelado, a cultura bacteriológica pode ser difícil ou impossível. Logo, a IHC pode ser um teste alternativo para estabelecer um diagnóstico (MORREL et al., 2011).

2.8 Outras bactérias e protozoários causadores de aborto

Existem inúmeros outros agentes infecciosos que causam aborto. Muitos destes são bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia sp.*, *Mannheimia sp*, *Proteus sp*, entre outras (Antoniassi et al., 2013).

A bactéria *Staphylococcus aureus* pode, por exemplo, acometer o feto e causar abortos esporádicos (ANDERSON et al., 1990). Coberllini et al. (2006) relata que em um feto necropsiado no Rio Grande do Sul observou-se que o *Staphylococcus* causou lesões circulares branco-amareladas de tamanho 0,5-3 mm distribuídas de forma aleatória por toda a pele do corpo, principalmente no pescoço. Neste caso, na coloração especial de Gram, foram observadas bactérias na forma de coco em pele, pulmão, fígado, rim, coração e abomaso. Na pele, era possível notar que as bactérias estavam presentes no interior de folículos pilosos imaturos, na derme, sem qualquer reação inflamatória. No pulmão, havia infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e células inflamatórias mononucleares, juntamente com bactérias no interior de bronquíolos e alvéolos. Um leve infiltrado linfocítico foi observado em torno dos vasos do coração, que continha, em seu lúmen, colônias bacterianas. Miosite discreta também foi encontrada, além de grande número de células inflamatórias mononucleares na lâmina própria do abomaso.

Outro agente que pode estar envolvido em casos de aborto é o protozoário *Trichomonas foetus*. Este protozoário coloniza a superfície do epitélio escamoso estratificado da vagina, glândula peniana, porção próxima do prepúcio e superfície mucosa do útero. Resulta num processo inflamatório na vagina, cérvix e endométrio produzindo um ambiente intrauterino hostil ao embrião causando sua morte aos 50-70 dias de gestação. O *T. foetus* pode ser achado nas descargas de piometra, fluidos placentários ou conteúdo do estômago fetal (GIVENS, 2006).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho contribuíram para o conhecimento dos principais agentes infecciosos causadores de aborto em bovinos do Sul do Estado de Minas Gerais, destacando como o agente mais frequente o protozoário *Neospora caninum* seguido de agentes bacterianos e virais. Apesar das lesões microscópicas direcionarem o diagnóstico para o agente envolvido, em muitas situações, o feto encontrava-se congelado ou em adiantado estado de autólise, impossibilitando os exames microscópicos, moleculares e microbiológicos de vários tecidos. Nos casos do estudo retrospectivo, muitas vezes, poucas amostras de tecido foram coletadas, somado a isso, não havia material disponível para cultura e para técnica de reação da cadeia de polimerase. O não envio da placenta nos casos estudados também pode ter interferido no diagnóstico.

Adicionalmente, os resultados aqui apresentados ressaltam a importância da utilização de mais de uma técnica de diagnóstico, uma vez que, nem sempre as lesões microscópicas são específicas para um único agente etiológico.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Brucelosis. In: _____. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis**. 3. ed. Washington: OPS, 2001. v. 1, p. 28-56.

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvírus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 43, p. 36-40, 1982.

ADREOTTI, R. et al. Association between seropositivy for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 119-123, abr./jun. 2010.

AGUIAR, D. M. et al. Soroprevalence of *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality western Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 102-104, abr./jun. 2006.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C. Consequências da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 86-93, mar. 1998.

ALMEIDA, A. C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R. M. Z. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 275-276, abr. 2004.

ALVES, T. M. et al. Campilobacteriose genital bovina e tricomoníase genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 336-344, abr. 2011.

ANDERSON, M. L. et al. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 2, n. 4, p. 283-287, Oct. 1990.

ANDERSON, T. D.; MEADOR, V. P.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*: 1., gross and histologic lesions. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 23, p. 219-226, 1986.

ANTONIASSI, N. A. B. et al. Causas de aborto bovino diagnosticadas no setor de patologia veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 155-160, fev. 2013.

_____. Diagnóstico das causas infecciosas de aborto em bovinos. **Biológico**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 69-72, jul./dez. 2007.

ATKINSON, R. et al. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 110-114, Mar. 2000.

BACHOFEN, C. et al. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. **Veterinary Research**, Chicago, v. 44, n. 1, p. 32-41, May 2013.

BARGEN, K. von et al. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 533-562, May 2012.

BARR, B. C. et al. Neospora-like protozoal infections with bovine abortion. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 28, n. 2, p. 110-116, Mar. 1991.

BASZLER, T. V. et al. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 32, n. 6, p. 609-618, Nov. 1995.

BIUK-RUDAN, N. et al. Prevalence of antibodies to IBR and BVD virus in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, n. 5, p. 875-881, Apr. 1999.

BJÖRKMAN, C. et al. *Neospora caninum* and bovine diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. **The Veterinary Journal**, London, v. 159, n. 2, p. 201-206, Mar. 2000.

BRANKA, V.; DUBRAVKA, M.; BUGARSKI, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* in neural forms of listeriosis and abortions in ruminants. **Acta Veterinaria**, Beograd, v. 56, n. 4, p. 343-351, Nov. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal: manual técnico**. Brasília, 2006. 188 p.

BRODERSEN, B. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Clinical and Food Animal**, Los Angeles, v. 20, n. 1, p. 85-93, Mar. 2004.

CAMPERO, C. M. et al. Aetiology of bovine abortion in Argentina. **Veterinary Research Communication**, Dordrecht, v. 27, n. 5, p. 359-369, July 2003.

CARVALHO NETO, A. V. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 184, n. 2, p. 146-155, May 2010.

CAVAZINI, N. C. et al. Eficiência reprodutiva de vacas com leptospirose após tratamento com sulfato de estreptomicina. **Revista da FZVA**, Uruguaiiana, v. 15, n. 1, p. 152-159, 2008.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 195-202, Jan. 2002.

_____. *Staphylococcus* spp. abortion: skin lesions caused by *Staphylococcus aureus* infection in an aborted bovine-fetus. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 30, n. 7, p. 717-721, Oct. 2006.

CROOK, T. et al. Bovine herpesvírus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of hematogenous spread within the fetus in natural cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 24, n. 4, p. 662-670, July 2012.

DENNETT, D. P.; BARASA, J. O.; JOHNSON, R. H. Infectious bovine rhinotracheitis vírus: studies on the venereal carrier status in range cattle. **Research in veterinary Science**, London, v. 20, p. 77-83, 1976.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea vírus and its interaction with the host. In: Baker, J. C.; Houe, H. (Ed.). **Bovine viral diarrhoea vírus**. Philadelphia: Veterinary Clinics of North America, 1995. p. 394-424.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 41, n. 2, p. 1-16, Jan. 2003.

DUBEY, J. P.; BUXON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 134, n. 4, p. 267-89, May 2006.

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 208, n. 2, p. 263-265, Jan. 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 1-59, Mar. 1996.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1/2, p. 1-34, Aug. 2006.

_____. Neosporosis in animals: the last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.

EASTON, C.; PAULLIER, C.; BAÑALES, P. Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en LA DILAVE "Miguel C. Rubins", Uruguay. **El sitio de La Producción Animal**, Montevideo, n. 152/153, p. 25-30, 2003.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 463-478, Nov. 1994.

ELLIS, W. A.; O'BRIEN, J. J.; CASSELLS, J. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. **Veterinary Record**, London, v. 108, n. 26, p. 555-557, 1981.

ELSHEIKHA, H. M. et al. Effects of *Neospora caninum* infection on brain microvascular endothelial cells bioenergetics. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 6, p. 1-10, Jan. 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Prevalência da leptospirose em bovinos do pantanal mato-grossense**. Brasília, 1999. 9 p. (Comunicado Técnico, 22).

ENRIGHT, F. M. et al. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 45, p. 424-430, 1984.

ENRIGHT, F. M.; SAMARTINO, L. Mechanism of abortion in *Brucella abortus* infected cattle. **Proceeding Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, Virginia, v. 5, p. 88-95, 1994.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 126, n. 2/3, p. 79-94, Jan. 2002.

FAIRLEY, R. A.; CHOLLUM, L. M.; BLACKMORE, D. K. Leptospirosis associated with serovar hardjo and Pomona in Red deer calves (*Cervus elaphus*) New Zealand. **Veterinary Journal**, London, v. 32, p. 76-78, 1984.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 125-134, jul./set. 2005.

FRANCO, A. C.; ROECHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 433-488.

FRAY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 60/61, p. 615-627, 2000.

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

GROOMS, D. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea vírus and leptospirosis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 3, p. 624-628, Aug. 2006.

GROOMS, D. L.; BAKER, J. C.; AMES, T. R. Diseases caused by bovine vírus diarrhea vírus. In: SMITH, B. P. (Ed.). **Large animals internal medicine: diseases of horses, cattle, sheep and goats**. 3rd ed. Saint Louis: Mosby, 2002. p. 707-714.

HAYDEN, J. D. et al. The promises and pitfalls of PCR. **Reviews in Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 2, p. 129-137, 1991.

HONG, C. B. et al. *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 28, n. 6, p. 429-496, Nov. 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagrropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201103_3.shtm>. Acesso em: 2 jan. 2012.

JARRET, I. V. et al. Diagnostic studies of the fetus, placenta and maternal blood from 265 bovine abortions. **Cornell Veterinary**, Ithaca, v. 74, p. 8-20, 1984.

JONKER, F. H. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 82/83, p. 415-430, 2004.

KANUYA, N. L. et al. A study on reproductive performance and related factors of zebu cows in pastoral herds in a semi-arid área os Tanzania. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, n. 9, p. 1859-1874, June 2006.

KENNEDY, P. C.; MILLER, R. B. The female genital system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Ed.). **Pathology of domestic animals**. 4th ed. London: Academic, 1993. p. 349-469.

KENNEDY, P. C.; RICHARDS, W. P. C. The pathology of abortion caused by the vírus of infectious bovine rhinotracheitis. **Pathology Veterinary**, Basel, v. 2, p. 7-17, 1964.

KIRKBRIDE, C. A. **Laboratory diagnosis of livestock abortion**. 3rd ed. Ames: Iowa State University, 1990. 274 p.

_____. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, n. 4, p. 374-379, Oct. 1992.

KUNRATH, C. F. et al. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1877-1883, nov./dez. 2004.

LAMING, E. et al. Demonstration of early functional compromise of bone marrow derived hematopoietic progenitor cells during bovine neonatal pancytopenia through *in vitro* culture of bone marrow biopsies. **BMC Research Notes**, London, v. 5, p. 599-602, Oct. 2012.

LANGONI, H. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 40, n. 3/4, p. 271-275, July 1999.

LOEB, E. Encephalitic listeriosis in ruminants: immunohistochemistry as a diagnostic tool. **Journal Veterinary Medicine**, Berlin, v. 51, n. 9/10, p. 453-455, Dec. 2004.

LOW, J. C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 153, n. 1, p. 9-29, Jan. 1997.

MALEY, S. W. et al. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 129, n. 2/3, p. 186-195, Aug./Oct. 2003.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. Sistema reprodutivo da fêmea. In: _____. **Bases da patologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 1296-1318.

MEDINA, L. et al. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetus from dairy farms in Aguascalientes, México. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, n. 3/4, p. 187-191, Mar. 2006.

MESQUITA, L. P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2013. In press.

MORREL, E. L. et al. Histopathological, immunohistochemical, lectin histochemical and molecular finding in spontaneous bovine abortions by campylobacter fetus. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 309-315, Apr. 2011.

MSHELIA, G. D. et al. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 221-230, Apr. 2010.

MURRAY, R. D. Lesion in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. **Archives of virology - Supplementum**, Wien, v. 3, n. 3, p. 217-224, Mar. 1991.

NELSON, D. D. et al. Evidence for persistent *Bovine Viral Diarrhea Virus* infection in a captive mountain goat (*Oreamnos Americanus*). **Journal of Veterinary Investigation**, Columbia, v. 20, n. 6, p. 752-759, Nov. 2008.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, New York, v. 24, p. 69-95, 1980.

OLDONI, I. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvírus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 2, p. 213-221, Feb. 2004.

OLIVEIRA, F. C. S. et al. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 398-402, May 2010.

ORDORFF, P. E. et al. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1/2, p. 1-15, Apr. 2006.

ORTEGA-MORA, L. M. et al. Determination of *Neospora caninum* in sêmen of bulls. **Veterinary Parasitology**, Columbia, v. 117, n. 4, p. 301-308, Nov. 2003.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Direction of *Neospora Caninum* DNA by the Polymerase chain position. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 347-351, Apr. 1996.

PEREZ, J. P. et al. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 10, n. 1, p. 17-21, Jan. 1998.

PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1/2, p. 159-163, Nov. 2007.

PLOMMET, M. et al. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheeses made from naturally infect cow's milk. **Le Lait**, Quebec, v. 2, p. 115-120, 1988.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine**. 8th ed. London: Ballière Tindall, 1994. 1736 p.

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle: the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 133-142, Feb. 2013.

RIET-CORREA, F. et al. Doenças bacterianas. In: _____. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3. ed. Santa Maria: Fernovi, 2007. p. 524-532.

RISSI, D. R. et al. Forma nervosa de listeriose em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 14-20, jan./mar. 2006.

RODGER, S. M. et al. Microscopical lesions and antigen distribution in bovine fetal tissues and placenta following experimental infection with bovine herpesvírus-1 during pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 137, n. 2/3, p. 94-101, Aug./Oct. 2007.

RÜFENACH, J. et al. The effect of infections with bovine vírus diarrhea vírus on the fertility of swiss dairy cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 56, p. 199-210, 2001.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Patogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 95-101, Apr. 1993.

SANTOS, D. S. et al. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 281-288, dez. 2011.

SANTOS, R. L. et al. Detección de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa en el testículo y en el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. **Archivos de Reproducción Animal**, Madrid, v. 6, n. 6, p. 34-41, 1998.

SCHLAFER, D. H.; MILLER, R. B. Female genital system. In: Maxie, M. G. (Ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals**. Philadelphia: Elsevier, 2007a. v. 3, p. 429-564.

_____. Pathology of the gravid uterus, placenta and fetus abortion and stillbirth. In: Maxie, M. G. (Ed.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals**. Philadelphia: Elsevier, 2007b. v. 3, p. 529-531.

SCHMITZ, M. **Caracterização patológica e imunoistoquímica pelo vírus da diarreia viral bovina**. 2006. 54 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SILVA, F. L. et al. Brucelose bovina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 47, p. 1-12, abr. 2005.

SUEPAUL, S. M. et al. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. **Tropical Animal Health Production**, Edinburgh, v. 43, n. 2, p. 367-375, Feb. 2011.

SZEREDI, L.; HAAKE, D. A. Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 43, n. 5, p. 755-761, Sept. 2006.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciência Agrária**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 203-209, jul./dez. 2001.

THIRE, E.; DUBUISSON, J.; PASTORET, P. P. Pathogenesis, latency and reactivation of infection by herpesvírus. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Epizooties**, Paris, v. 5, p. 809-819, 1986.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 558-561, Dec. 2005.

VANROOSE, G. Interaction of bovine viral diarrhoea vírus and foot-and-mouth disease vírus with bovine reproductive tissue and embryos. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, v. 35, n. 6, p. 273-276, Dec. 2000.

VANROOSE, G.; KRUIF, A.; SOOM, A. V. Embryonic mortality and embryo-pathogen interaction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 60/61, p. 131-143, July 2000a.

VARASCHIN, M. S. et al. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. **Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 50, n. 1, p. 63-67, Mar. 2012.

VARASCHIN, M. S.; WOUTERS, F. **Patologia especial das principais doenças transmitíveis na reprodução de bovinos**. Lavras: UFLA, 2006. 52 p.

VASCONCELLOS, S. A. et al. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul: período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 7-15, 1997.

WILD, C. J. et al. An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 14, n. 1, p. 20-24, Jan. 2002.

WOUDA, W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 545-547, June 1997.

WOUTERS, F. Diarreia bovina a vírus: doença das mucosas. In: VARASCHIN, M. S. (Ed.). **Patologia especial das principais doenças transmissíveis na reprodução e bovinos**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 27-36.

XAVIER, M. N. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 140, n. 2/3, p. 149-157, Feb./Apr. 2009.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do Sul do Estado de
Minas Gerais, Brasil**

Este artigo foi redigido de acordo com a norma da *Pesquisa
Veterinária Brasileira para submissão*

Débora R. Orlando², Rafael C. Costa², Bruno A. Soares², Natália S. C. Oliveira², Lismara C. Nascimento², Ana P. Peconick², Djeison L. Raymundo² e
Mary S. Varaschin^{2*}

ABSTRACT.- Orlando D.R., Costa R.C., Soares B.A., Oliveira N.S.C., Nascimento L.C., Peconick A.P., Raymundo D.L. & Varaschin M.S. 2013. [*Neospora caninum* abortions in cattle in southern Minas Gerais State, Brazil.] Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil. E-mail: msvaraschin@dmv.ufla.br.

The present study evaluates the participation of *N. caninum* in bovine abortions from farms in the southern region of Minas Gerais state, Brazil, through histopathological and immunohistochemical (IHQ) analysis and DNA detection by polymerase chain reaction (PCR). The material used in this study was obtained through retrospective study of bovine abortion cases received by the Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras and by necropsies performed in fetuses from 2011 and 2013. From 60 fetuses studied, 30 (50%) had microscopic lesions. Of these, 19 (63%) had histologic lesions compatible with *N. caninum* abortion, characterized by multifocal non-suppurative encephalitis, necrosis and gliosis in the central nervous system and multifocal nonsuppurative myocarditis and myositis. Of the 19 fetuses with protozoa lesions in 14 the final diagnosis were performed. Of these, nine were confirmed by IHQ staining and five were positive by PCR. Four fetuses were positive in both IHC and in PCR. In five fetuses from the retrospective study lesions compatible with *N. caninum* were seen, but the presence of the protozoan was not confirmed by IHQ labeling. The findings demonstrate that the *N. caninum* was the main agent associated with abortion in cattle from Minas Gerais State. Therefore, beyond the microscopic lesions association between IHC and PCR was essential to confirm the diagnosis.

INDEX TERMS: diseases of reproduction, neosporosis, protozoan, ruminant, PCR, IHQ

RESUMO.- Este estudo avaliou a participação do *N. caninum* em casos de abortos em bovinos provenientes de propriedades rurais da região sul de Minas Gerais por meio de análises histopatológicas, imuno-histoquímicas (IHQ) e pela reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O material utilizado foi obtido de um estudo retrospectivo de casos de aborto recebidos pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras e de fetos necropsiados durante os anos de 2011 a 2013. De 60 fetos estudados, 30 (50%) tinham lesões microscópicas. Destes, 19 (63%) apresentaram lesões compatíveis com aborto por *N. caninum*, caracterizadas principalmente por encefalite não supurativa multifocal, necrose e gliose

multifocal, assim como, miocardite e miosite não supurativa. Em 14 fetos chegou-se ao diagnóstico definitivo. Destes, nove tiveram sua confirmação pela marcação IHQ e cinco foram positivos na PCR. Quatro fetos foram positivos tanto na IHQ quanto na PCR. Cinco fetos, provenientes do estudo retrospectivo apresentaram lesões compatíveis com *N. caninum*, mas a presença do protozoário não foi confirmada pela marcação IHQ. Os achados demonstram que o *N. caninum* foi o principal agente associado ao aborto em bovinos na região sul de Minas Gerais. Para tanto, além das lesões microscópicas a associação entre a IHQ e a técnica de PCR foi essencial para a confirmação do diagnóstico.

TERMO DE INDEXAÇÃO: doenças da reprodução, neosporose, protozoário; ruminante, PCR, IHQ.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário coccídeo, intracelular obrigatório que pode infectar várias espécies animais, dentre elas canídeos domésticos e selvagens, bovinos, equídeos (Adreotti 2010) e caprinos (Dubey 2003, Varaschin et al 2012, Mesquita et al. 2013). Este parasito possui uma eficiente capacidade de transmissão dentro do rebanho, podendo infectar até 90% dos animais (Dubey et al. 2006)

A principal manifestação clínica de bovinos infectados pelo *N. caninum* é o aborto entre o terceiro e o oitavo mês de gestação. Porém, a morte fetal, em uma fase inicial da gestação, com consequente reabsorção do feto e repetição de cio, também pode ocorrer (Barr 1991). Desta forma, os prejuízos financeiros vão além da perda com o aborto, pois pode ocorrer uma queda na produção de leite e um descarte precoce dos animais afetados (Collantes-Fernández et al. 2006). Estudos demonstram que o Brasil perde, anualmente, devido a neosporose, 51,3 milhões de dólares na pecuária leiteira e 101,0 milhões de dólares no setor de corte (Reichel et al. 2013).

A patogenia do aborto é muito complexa e parcialmente compreendida. Sabe-se que para sua ocorrência, é necessário um contato primário da vaca prenhe com *N. caninum* ou a reativação do protozoário que se encontra encistado nos tecidos, os quais são provenientes de um contato prévio do bovino com este agente. Consequentemente, ocorre a parasitemia, a infecção da placenta e posteriormente do feto (Dubey et al. 2006).

A morte do feto pode ser devido a lesões na placenta, lesões no feto ou ambos. As lesões provocadas pela multiplicação do parasito na placenta podem prejudicar a oxigenação do feto e provocar a liberação de prostaglandinas e/ou citocinas inflamatórias comprometendo a sobrevivência fetal. Há ainda a liberação de hormônio adrenocorticotrófico fetal com posterior estímulo a expulsão do mesmo (Dubey et al. 2006). Mais frequentemente são observadas áreas de necrose em vários tecidos fetais, além de encefalite e gliose no sistema nervoso central, e miosite e miocardite mononuclear (Dubey & Lindsay 1996, Wouda et al. 1997, Corbellini et al. 2002, Santos et al. 2011, Varaschin et al. 2012).

O diagnóstico de neosporose, deve ser realizado mediante a associação das lesões encontradas na histopatologia com a imuno-histoquímica (IHQ) (Dubey & Lindsay 1996) e/ou a reação em cadeia de polimerase (PCR) (Payne & Ellis 1996, Santos et al. 2011). Apesar das lesões microscópicas presentes nos tecidos, os protozoários não são facilmente visualizados pelas colorações de rotina, ou podem não estar presente nos tecidos analisados. A IHQ auxilia na visualização do agente etiológico quando há poucos taquizoítos ou cistos nos tecidos e quando o material encontra-se em adiantado estado de autólise (Dubey 2003). Já a PCR, por se basear na detecção de porções do genoma, oferece, entre outros benefícios, uma sensibilidade maior quando comparado com de algumas técnicas de diagnóstico (Payne & Ellis 1996, Medina et al. 2006).

O estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de leite do Brasil, com aproximadamente 25,6% da produção nacional (IBGE, 2012). A frequência de *N. caninum* como agente causador de abortos em bovinos de Minas Gerais é desconhecida e conseqüentemente não se sabe a importância desta doença na ocorrência de abortos no rebanho leiteiro, uma vez que, muitos dos estudos realizados são de soroprevalência (Dubey & Schares, 2011). A região estudada pertence a uma grande bacia leiteira do Sul de Minas Gerais, que contribui juntamente com a região sudeste com aproximadamente 18% da produção do estado (IBGE, 2012) e conseqüentemente a neosporose pode impactar significativamente na economia da região.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a participação de *N. caninum* como agente causador de aborto em bovinos na região sul de Minas Gerais. Assim como caracterizar as principais lesões encontradas, determinar quais são os tecidos mais afetados e comparar a eficiência da técnica de IHQ em relação a PCR no diagnóstico da neosporose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem e característica das amostras

O material de estudo foi proveniente de fetos bovinos necropsiados entre os anos de 2011 e 2013 (estudo prospectivo) e de uma análise retrospectiva de 10 anos de casos de aborto bovino recebidos pelo Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil.

Para a obtenção do histórico dos fetos, recebidos entre os anos de 2011 e 2013, era realizada uma anamnese com os proprietários e/ou veterinários, para coleta de dados sobre manejo e profilaxias. A idade fetal foi determinada por meio de registros de cobertura dos animais, fornecidos pelos proprietários, associado à mensuração do feto durante a necropsia conforme recomendado por Barr et al. (1990).

Durante a necropsia, amostras de sistema nervoso central (córtex dos hemisférios cerebrais e do cerebelo, tálamo, colículo rostral e caudal, pedúnculos cerebelares, óbex e medula cervical, torácica e lombar), músculos esqueléticos (occipital, semitendinoso, semimembranoso, infraespinhal, diafragma e língua), coração, esôfago, pulmão, fígado, rim, baço, linfonodos mesentéricos, intestinos,

timo, válvula íleo-cecal, ovário/testículo, útero, pele, rúmen, retículo, omaso, abomaso e glândulo trigeminal, foram coletados em formalina a 10% tamponada e processados rotineiramente para histopatologia. Cortes de 5µm de espessura foram corados pela Hematoxilina e Eosina e avaliados mediante microscopia ótica.

Os tecidos dos fetos que apresentassem lesões compatíveis com neosporose eram submetidos a marcação imuno-histoquímica e a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase. Para a realização da PCR, amostras de córtex cerebral e ápice do coração foram coletados em tubos de *ependorfs* autoclavados, identificadas, congeladas a -20°C e armazenadas até a realização da mesma.

Técnica de Imuno-histoquímica

Para realização da imuno-histoquímica, os cortes histológicos em lâminas silanizadas, após desparafinados e reidratados, foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena por meio de peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. A recuperação antigênica foi feita por digestão enzimática com tripsina 0,1% (pH 7,8) por 10 minutos a 37°C, seguida pela recuperação pelo calor por 2 minutos no tampão citrato (pH 6,0). Para o bloqueio de reações inespecíficas, os cortes histopatológicos foram submergidos em solução de leite desnatado (Molico®, Nestlé) diluído em PBS a 5% por uma hora. As lâminas foram incubadas por 45 minutos a 37°C com anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* na diluição de 1:2000 (VMRD, Pullman, USA), seguido pela incubação com o anticorpos secundários biotinilados conjulgados a streptavidina (Dako, Carpinteria, CA) por 20 minutos na temperatura ambiente. Na revelação utilizou-se o cromógeno Vector Red (Vector NovaRed®) no tempo de 1 a 5 minutos, e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina. Amostras de tecido placentário e de sistema nervoso central de caprinos contendo cistos de *N. caninum* (Varaschin et al., 2012) foram utilizadas como controles positivos e como controle negativo o anticorpo foi substituído por água destilada.

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As amostras de DNA foram extraídas de 40 mg de tecido, a partir das amostras de córtex cerebral e ápice do coração. A extração foi realizada utilizando-se o kit comercial Wizard SV Genomic Purification System (Promega, Madison, USA), por meio da técnica de lise por proteinase K, segundo as recomendações do fabricante. As concentrações (ng/µl) e qualidade do DNA extraído foram determinadas no espectrofotômetro NanoVue™ plus e eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Para a detecção de *Neospora caninum*, foram desenhados (utilizando software Primer-BLAST do NCBI) e sintetizados (Sigma-Aldrich) iniciadores para a amplificação de sequências genéticas do protozoário em questão, tendo como molde seu cromossomo XII. Desta forma, os primers forwards CTGTTAGAAGGTGCGGCGAA e reverse TCTCTTGCTGCGGTGGAAT amplificam um fragmento de 168pb.

Cada reação de cadeia de polimerase foi constituída de 4X de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 75 mM de MgCl₂; 5 mM de dNTPs; 50 ng da amostra de DNA; 1,6 U da Taq DNA Polimerase Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega), 5 mM dos iniciadores *forward* e *reverse*; água deionizada autoclavada para completar um volume final de 25 µl. Como controle positivo, foi utilizada amostra de placenta de cabra naturalmente infectada por *N. caninum* (Varaschin et al. 2012), um controle negativo (um feto sem lesões de neosporose e com diagnóstico negativo em diferentes técnicas para a presença do protozoário) e um controle branco.

As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) conforme o seguinte protocolo: desnaturação a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, anelamento de 57 °C por 1 min, extensão a 72 °C por dois minutos e trinta segundos e extensão final a 72 °C por 7 min. As amostras foram aplicadas em gel de agarose de alta resolução 1,5%, corado com Gel Red™ 1X, na voltagem de 120 volts em cuba de eletroforese horizontal, contendo TBE (Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M) como tampão de corrida. Com o auxílio de padrão de peso molecular (Ladder da Ludwig 100PB 250 microlitros) as bandas foram identificadas.

Sequenciamento do material

Os fragmentos dos genes amplificados na PCR e visualizados na eletroforese em gel de agarose com o tamanho esperado foram purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®), de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, esses fragmentos foram submetidos ao sequenciamento genético no sequenciador automático capilar ABI310 (Applied Biosystems) pelo método enzimático descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

Para análise *in silico* e subsequente confirmação da especificidade, utilizou-se o programa BlastN (Altschul et al., 1990) para comparar com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no banco de dados do NCBI .

RESULTADOS

Distribuição amostral: estudo retrospectivo e fetos necropsiados

De 60 fetos estudados em 51 deles a origem da região sul de Minas Gerais foi confirmada. Destes, 30 fetos, todos provenientes do sul de Minas Gerias (50%), apresentaram lesões microscópicas e em 19 (63%) lesões compatíveis com aborto por *N. caninum* foram observadas. Em 14 fetos chegou-se ao diagnóstico definitivo. Destes, nove tiveram sua confirmação pela marcação IHQ e cinco foram positivos na PCR. Quatro fetos foram positivos tanto na IHQ quanto na PCR. Cinco fetos, provenientes do estudo retrospectivo apresentaram lesões compatíveis com *N.*

caninum, mas a presença do protozoário não foi confirmada pela marcação IHQ e pela PCR?

Em trinta fetos não foi possível diagnosticar a etiologia do aborto, sendo que, sete estavam em adiantado estado de autólise e vinte e três não apresentaram lesões. Muitos foram provenientes do estudo retrospectivo onde os tecidos coletados foram insuficientes para o diagnóstico, não podendo também, ser descartada a possibilidade de que a origem destes abortos não fosse infecciosa.

A idade gestacional predominante dos 19 fetos foi entre o quinto e sexto mês de gestação (fig. 1).

Achados macroscópicos e microscópicos dos abortos por *N.caninum*

Não foram observadas lesões macroscópicas nos 19 fetos. As lesões microscópicas compatíveis com neosporose ocorreram mais frequentes no coração, seguido de musculatura esquelética, encéfalo e fígado.

As lesões encontradas nos músculos cardíacos e esqueléticos eram constituídas por áreas focais ou multifocais de infiltrado inflamatório entre os feixes musculares de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, sendo que, a miocardite mononuclear moderada a acentuada (Fig. 2) foi observada em 16 fetos (84,21%) e a miosite mononuclear moderada a acentuada (Fig. 3) foi observada em 15 fetos (78,94%). No material proveniente do estudo retrospectivo não havia identificação de quais músculos foram coletados, porém em um feto foi possível identificar a miosite na musculatura da língua. Já nos fetos do estudo prospectivo, cinco apresentaram miosite no músculo semitendinoso, três no músculo infraespinhoso, quatro no músculo semimembranoso, três no diafragma e apenas um no músculo occipital.

No SNC as lesões observadas foram áreas de gliose em regiões do córtex cerebral (52,63%), colículos (21,05%), córtex cerebelar (21,05%), tálamo (10,52%), bulbo ao nível do óbex (5,266%) e pedúnculo cerebelar (5,26%). Áreas multifocais de necrose caracterizadas por acidofilia do tecido e núcleos picnóticos, circundadas por células da glia e/ou infiltrado inflamatório mononuclear (Fig. 4) foram observadas em 36,84% dos fetos com lesões de neosporose. Sendo que dos 19 fetos, 36,84% apresentaram essa lesão em córtex, 15,78% no colículo, 10,52% no cerebelo e em 5,26 % dos fetos no tálamo.

As lesões no fígado consistiram de infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta e, por vezes, áreas multifocais de necrose. Este tipo de lesão estava presente em 31,57% dos fetos com lesões de neosporose.

Estruturas compatíveis com o protozoário, sempre próximas ao infiltrado inflamatório, foram observadas em quatro fetos (21,05%) pela coloração de Hematoxilina-Eosina (H.E). Em dois fetos do estudo retrospectivo foi visualizado cisto contendo bradizoítos, no córtex cerebral (feto 1) e em musculatura esquelética (cisto jovem, de parede fina) (feto 7) (Fig. 5). No feto 14, do estudo prospectivo, um cisto jovem (parede fina), foi observada no cerebelo. Já, estruturas parasitárias semelhantes a taquizoítos foram observados na musculatura esquelética (feto 2).

Achados imuno-histoquímicos

A imunomarcção ocorreu somente com o anticorpo policlonal anti-*Neospora caninum* em 9 fetos (47,36%) dos 19 fetos que apresentaram lesões sugestivas de aborto por protozoário. A marcação mais frequente ocorreu no sistema nervoso central (66,66%), seguido de musculatura esquelética (22,22%) e cardíaca (11,11%). O local da imunomarcção esta detalhado no quadro 1 assim como o mês em que ocorreu o aborto. As figuras 6 e 7 ilustram a imunomarcção para *Neospora caninum* dos fetos 11 e 12.

Análises moleculares

Dos 19 fetos que possuíam lesões compatíveis com neosporose, nove foram positivos na PCR, totalizando 47,36% dos fetos. No quadro 2 são destacadas quais amostras coletadas foram detectadas a presença do DNA do *N.caninum* pela técnica de PCR. O sequenciamento confirmou o diagnóstico de *N. caninum* nestes tecidos.

DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que a grande maioria dos fetos suspeitos e com o diagnóstico confirmado de neosporose (63%) foram abortados entre o quinto e sexto mês de gestação. Estes achados são compatíveis com os descritos por Sager et al (2001) que descreve uma maior frequência entre o quinto ao sétimo mês de gestação, e Antoniassi et al (2013) o qual relata em seu estudo que 62% dos fetos abortados encontravam-se no segundo trimestre da gestação.

As lesões mais frequentemente descritas em fetos bovinos com neosporose são a necrose focal circundada por infiltrado inflamatório mononuclear discreto, encontradas principalmente no sistema nervoso central (Sager et al. 2001, Maley et al. 2003, Benavides et al. 2012). No presente estudo, apesar destas lesões estarem presentes, o achado mais comum foi o infiltrado inflamatório mononuclear, na musculatura cardíaca e esquelética. Achados estes, semelhantes aos de Pescador et al. (2007) que observou que a musculatura esquelética foi a mais afetada. Dos fetos necropsiados no estudo prospectivo foi possível a coleta e a identificação da musculatura esquelética, onde os músculos mais frequentemente acometidos e ordem decrescente foram: o músculo semitendinoso, infraespinhoso, semimembranoso, diafragma e occipital. Estes achados podem indicar um padrão de coleta da musculatura esquelética para o diagnóstico da neosporose em fetos. A necrose hepática e hepatite ocorreram menos frequentemente neste estudo. Estes achados são semelhantes aos descritos por Maley et al. (2003) e Benavides et al. (2012).

Dos 14 abortos comprovadamente positivos, quatro (28,57%) foram confirmados em ambos os testes, cinco (35,71%) apenas pela PCR e cinco apenas (35,71%) pela imuno-histoquímica. Porém é pertinente observar que dos cinco fetos confirmados pela IHQ, em três fetos, a PCR não foi realizada por se tratar de

material do estudo retrospectivo, onde os tecidos estavam disponíveis somente em blocos de parafina. Desta forma, nos fetos que passaram pelas duas técnicas a PCR apresentou uma maior sensibilidade (55,55%) quando comparada a imuno-histoquímica (22,22%). Esses resultados, em que a PCR supera em sensibilidade a imuno-histoquímica, tem sido descrito por vários autores (Payne & Ellis 1996, Santos et al., 2011). Seguindo este mesmo raciocínio, observa-se que os fetos classificados como suspeitos (5 fetos) provenientes principalmente do estudo retrospectivo (4 fetos) foram aqueles em que as lesões eram compatíveis com as causadas por protozoários, mas que não houve imunomarcagem, provavelmente por não haver estruturas parasitárias nos tecidos coletados. Nestes fetos também não haviam tecidos congelados disponíveis para a realização da PCR, comprometendo assim, o diagnóstico definitivo. Porém ressalta-se que muitos fetos podem apresentar adiantado estado de autólise, dificultando o isolamento e identificação do agente sendo a imuno-histoquímica um método viável e importante para o diagnóstico (SANTOS et al., 2011).

O diagnóstico de aborto por *N. caninum* foi baseado na presença de lesões microscópicas como miosite, miocardite e gliose (com ou sem necrose), as quais sinalizam para a presença deste protozoário, associado com a marcação imuno-histoquímica positiva somente para *N.caninum* e os resultados do sequenciamento genético. Os resultados encontrados neste estudo permitem concluir que *N.caninum*, atualmente é o agente etiológico mais frequentemente associado a aborto em bovinos no sul de Minas Gerais e que para o diagnóstico definitivo é extremamente importante a associação de mais de uma técnica de diagnóstico.

Agradecimento: A FAPEMIG pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro. Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

Referência Bibliográfica:

- Adreotti R., Barros J.C., Pereira A.R., Oshiro L.M., Cunha R.C., Figueiredo Neto L.F. 2010. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19: 119-23.
- Antoniassi N.A.B., Juffo G.D., Santos A.S., Pescador C.A., Corbellini L.G., Driemeier D. 2013. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. Pesqui. Vet. Bras. 33:155-160.
- Barr C.B., Anderson M. L., Dubey J. P., Conrad P. A. 1991. Neospora-like Protozoal Infections with Bovine Abortion. Vet. Path. 28: 110-16.
- Barr C.B., Anderson M.L., Blanchard P.C., Daft B.M., Kinde H., Conrad P.A. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. Vet. Path. 27:354-361.
- Benavides J., Katzer F., Maley S.W., Bartley P.M., Cantón G., Palarea-Albaladejo J., Purslow C.A., Pang Y., Rocchi M.S., Chianini F., Buxton D., Innes E.A. 2012. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following

- experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Veterinary Research*. 43:1-13.
- Collantes-fernández E., Arnáiz-Seco I., Burgos B.M., Rodríguez-Bertos A., Aduriz g, Fernández-García A., Ortega-mora L.M. 2006. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Vet. Parasitol*. 142:187-91.
- Corbellini L. G., Driemeier D., Cruz C.F.E., Gondim L.F.P., Wald V. 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Vet. Parasitol*. 103:195-202.
- Dubey J.P., Buxton D., Wouda W. 2006. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J. Comp. Pathol*. 134:267-89.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol*. 67:1-59.
- Dubey, J. P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*. 41:116.
- Dubey, J.P., Shares, G. 2011. Neosporosis in animals- The last five years. *Vet. Pathol*. 180:90-108.
- Maley S.W., Buxton D., Rae A.G., Wright S.E., Shock A., Bartley P.M., Esteban-Redondo, Swales C., Hamilton C.M., Sales J., Innes E.A. 2003. The Pathogenesis of Neosporosis in Pregnant Cattle: Innoculation at mid-gestation. *J. Comp. Pathol*. 129:186-195.
- Medina L., Cruz-Várquez C., Quezada T., Morales E., García-Várquez Z. 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetus from dairy farms in Aguascalientes, México. *Vet. Parasitol*. 136:187-191.
- Mesquita L.P., Nogueira C.I., Costa R.C., Orlando D.R., Bruhn F.R.P., Lopes P.F.R., Nakagaki K.R.Y., Peconick A.P., Seixas J.N., Bezerra Júnior P.S., Raymundo D.L., Varaschin M.S. 2013. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013>.
- Payne S., Ellis J. 1996. Direction of *Neospora Caninum* DNA by the Polymerase chain position. *Int. J. Parasitol*. 26:347-51.
- Pescador C.A., Corbellini L.G., Oliveira E.C., Raymundo D.L., Driemeier D. 2007. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Vet. Parasitol*. 150: 159-163.
- Reichel M.P., Ayanegui-Alcérreca M.A., Gondim L.F.P., Ellis J.T. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int. J. Parasitol*. 43:133-142.
- Sager H., Fischer I., Furrer K., Strasser M., Waldvogel A., Boerlin P., Audigé L. & Gottstein B. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol*. 102:1-15.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. 24:104-108.
- Santos D.S., Andrade M.P., Varaschin M.S., Guimarães A.M., Hirsch C. 2011. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of Rdna. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20:281-288.
- Varaschin M.S., Hirsch C., Wouters F., Nakagaki K.R.Y, Guimarães A.M., Santos D.S., Bezerra Júnior P.S., Costa R.C., Peconick A.P., Langohr I.M. 2012. Congenital

Neosporosis in Goats from the State of Minas Gerais, Brazil. Korean Journal of Parasitology. 50:63-67.
Wouda W.; Dubey J.P., Jenkins M.C. 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. The Journal of Parasitology. 83:545-547.

FIGURAS E TABELAS

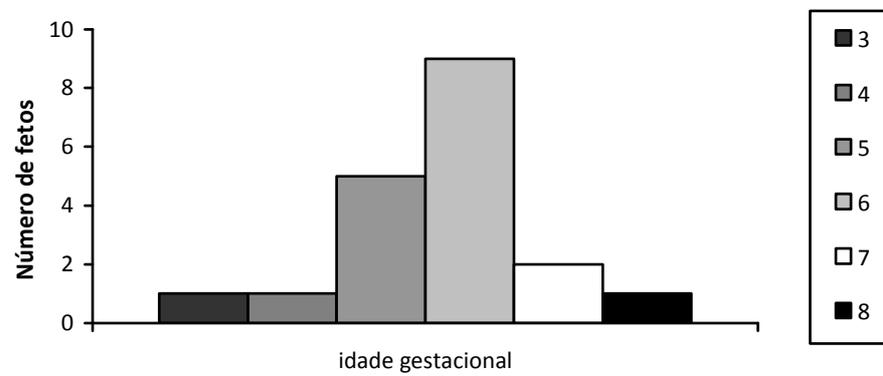


Fig. 1. Estudo retrospectivo e prospectivo de casos de aborto por *Neospora caninum* em bovinos. Número de casos e idade gestacional dos fetos abortados.

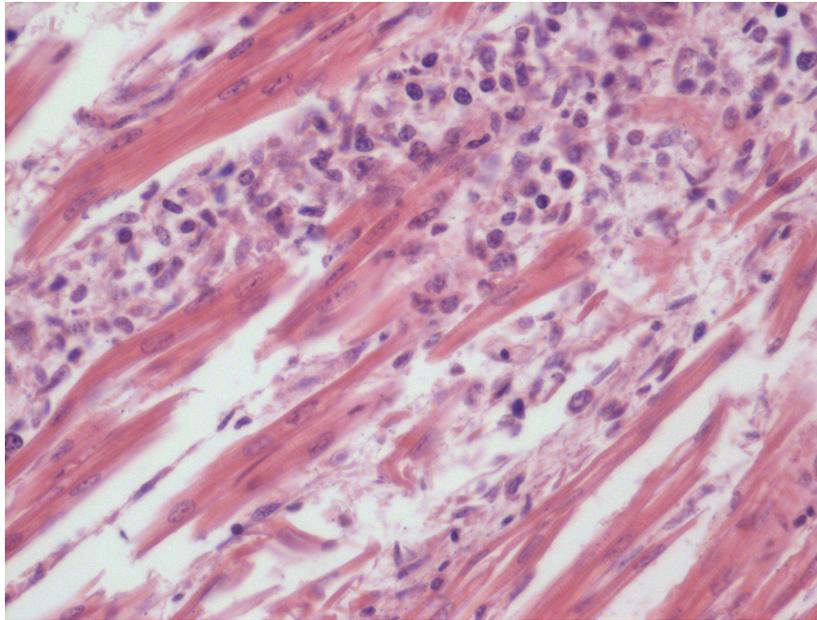


Fig. 2. Aborto por *Neospora caninum* em bovinos. Coração. Miocardite mononuclear acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.

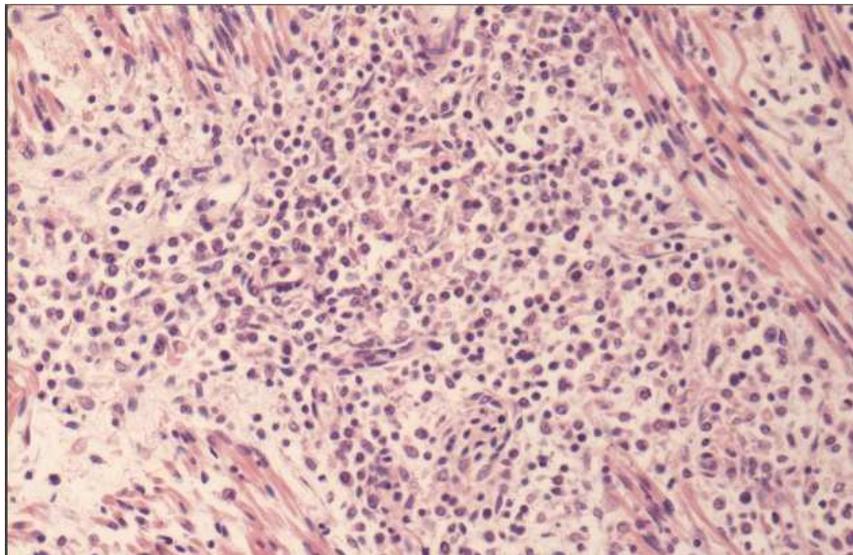


Fig. 3. Aborto por *Neospora caninum* em bovinos. Músculo esquelético. Miosite mononuclear acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj. 20.

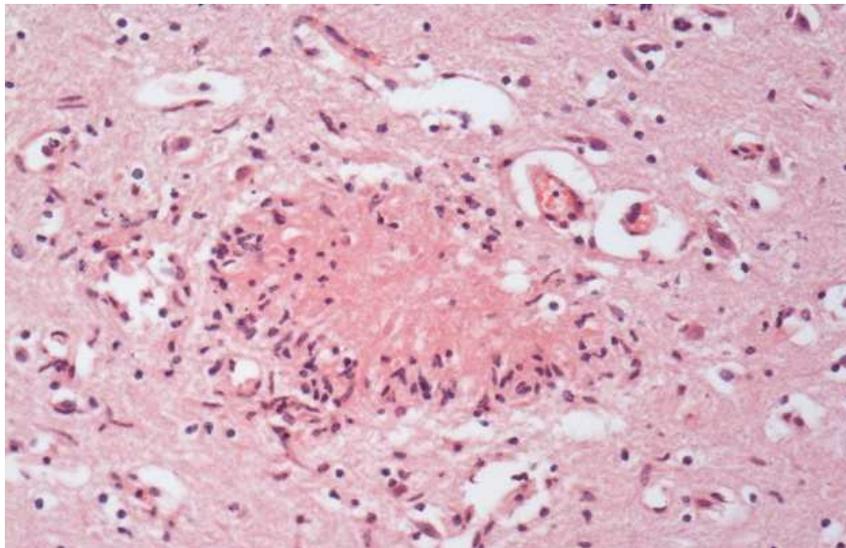


Fig. 4. Aborto por *Neospora caninum* em bovinos. Córtex cerebral. Área focal de necrose circundada por células da glia. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.

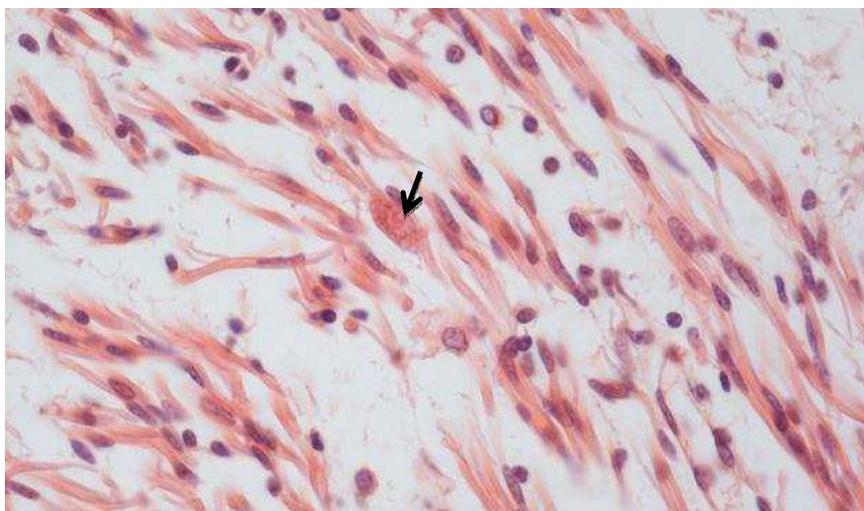


Fig.5. Aborto por *Neospora caninum* em bovinos. Músculo esquelético. Cisto jovem entre as fibras musculares (seta). Hematoxilina-Eosina. Obj.40.

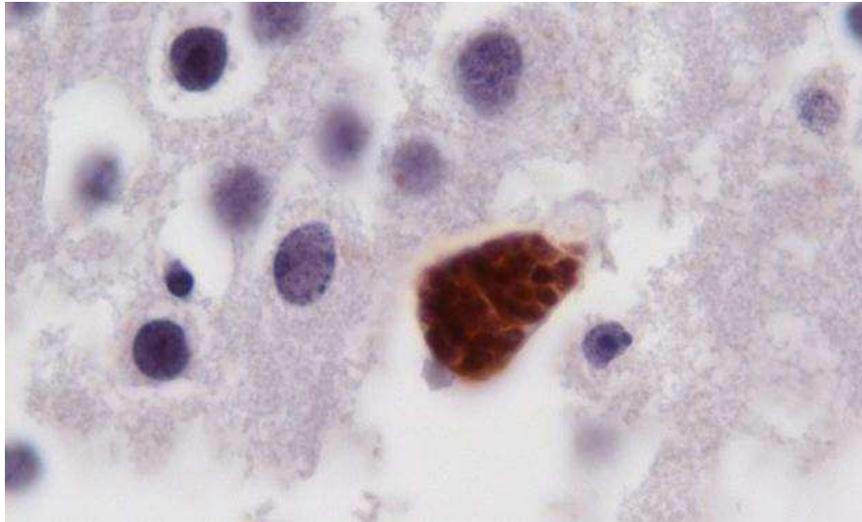


Fig. 6. Aborto por *Neospora caninum* em bovinos. Córtex cerebral. Taquizoítos marcados positivamente pelo anticorpo policlonal anti-*N. caninum* Imuno-histoquímica avidina-biotina. Obj. 100.

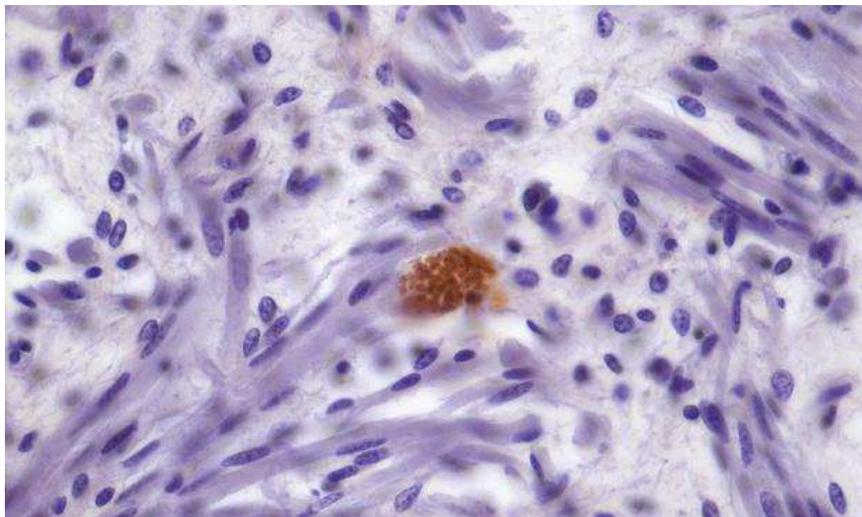


Fig. 7. Fig. 7. Aborto por *Neospora caninum* em bovinos. Musculatura da língua. Taquizoítos marcados positivamente pelo anticorpo policlonal anti-*N. caninum*. Imuno-histoquímica avidina-biotina. Obj. 40.

QUADRO 1. Local de imunomarcção para *Neospora caninum* e idade gestacional em que ocorreu o aborto

Feto	Marcação positiva	Idade gestacional
1*	Cisto no córtex cerebral	7 meses
2*	Taquizoito no córtex cerebral	6 meses
3*	Taquizoito na musculatura cardíaca	6 meses
6*	Cisto no córtex cerebral	5 meses
7*	Taquizoitos na musculatura esquelética	4 meses
11*	Taquizoitos na musculatura da língua	6 meses
12	Taquizoitos em córtex cerebral	6 meses
14	Cisto jovem no cerebelo	6 meses
18	Taquizoitos no córtex cerebral	6 meses

*Estudo retrospectivo

QUADRO 2. Relação dos tecidos positivos na técnica de PCR para *N. caninum* em fetos do Sul do Estado de Minas Gerais

Feto	Amostra	Órgão	PCR
2	07	Encéfalo	Positivo
	08	Coração	Negativo
4	05	Encéfalo	Positivo
	06	Coração	Negativo
7	15	Encéfalo	Positivo
	16	Coração	Negativo
13	33	Encéfalo	Positivo
	34	Coração	Positivo
14	27	Encéfalo	Positivo
	28	Coração	Positivo
15	29	Encéfalo	Positivo
	30	Coração	Positivo
16	31	Encéfalo	Positivo
	32	Coração	Positivo
17	35	Encéfalo	Positivo
	36	Coração	Positivo
18	37	Encéfalo	Positivo
	38	Coração	Positivo

*Estudo retrospectivo.

QUADRO 3. Comparação dos resultados das técnicas de imuno-histoquímica e PCR em relação a confirmação de diagnóstico de *Neospora caninum*

Feto	IHQ	PCR	Diagnóstico para <i>N. caninum</i>
1*	+	NR	+
2	+	+	+
3	+	-	+
4	-	+	+
5*	-	NR	Suspeito
6	+	N	+
7	+	+	+
8*	N	NR	Suspeito
9*	N	NR	Suspeito
10*	N	NR	Suspeito
11	+	NR	+
12*	+	NR	+
13	N	+	+
14	+	+	+
15	-	+	+
16	-	+	+
17	-	+	+
18	+	+	+
19*	-	NR	Suspeito

* = fetos do estudo retrospectivo. Suspeitos = fetos com lesões compatíveis com neosporose, mas que não houve confirmação pelos testes de diagnóstico utilizados, NR = não realizada, + = resultado positivo, - = resultado negativo.

(VERSÃO PRELIMINAR)

**ARTIGO 2 Agentes bacterianos e virais causadores de aborto bovino no
Sul do Estado de MINAS GERAIS, BRASIL**

Este artigo foi redigido de acordo com a norma da *Pesquisa Veterinária
Brasileira para submissão*

Débora Ribeiro Orlando², Rafael Carneiro Costa², Rafael Vitor S. Abreu²,
Camila Costa Abreu², Karen Yumi Nakagaki², Josilene Nascimento Seixas², Djeison
Lutier Raymundo², Mary Suzan Varaschin^{2*}

ABSTRACT.- Orlando D.R., Costa R.C., Abreu, R.V.S., Abreu C.C., Nakagaki K.Y., Seixas, J.N., Raymundo D.L., Varaschin, M.S. 2013. [**Bacterial and viral agents causing bovine abortion in the southern Minas Gerais, Brazil**] Agentes bacterianos e virais causadores de aborto bovino no estado de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil. E-mail: msvaraschin@dmv.ufla.br.

The present study evaluates the participation of bacterial and viral agents in bovine abortions from farms in the southern region of Minas Gerais state, Brazil, through histopathological, immunohistochemical and microbiological analysis. The material used was obtained through retrospective study of bovine abortion cases received by the Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras and by necropsies performed in fetuses from 2011 and 2013. From 60 fetuses studied, 30 (50%) had microscopic lesions. Of these, eight had lesions consistent with bacterial agents and three had lesions suggestive of viral agents. In the bacterial abortions, one fetus presented lesions compatible with leptospirosis characterized by jaundice, interstitial nephritis, tubular nephrosis and bilestase. Six fetous had purulent pneumonia or bronchopneumonia and one of them, also fibrinous pleuritis and peritonitis, where, two were positive immunostaining for *Brucella abortus*, and In four fetuses from the retrospective study it was unable to reach the etiologic agent, since these were negative on IHC for *Brucella* sp. The eighth fetus was positive in microbiology tests for *Staphylococcus* sp. The three fetuses with lesions of viral abortion, only one was immunohistochemical positive for bovine herpesvirus. The results show that the bacterial and viral abortions, although less frequent, still occurring and that prophylactic measures should be reviewed in many properties. Also demonstrated that IHC associated with histopathology can be a viable tool for diagnosis when microbiological and serological tests are not available.

INDEX TERMS: brucellosis, *Leptospira*, *Staphylococcus*, livestock, IHQ.

RESUMO.- O presente estudo avaliou a participação de agentes bacterianos e virais em abortos bovinos provenientes de propriedades rurais do sul de Minas Gerais, através da análise histopatológica, imuno-histoquímica e provas microbiológicas. O material utilizado foi proveniente de um estudo retrospectivo de casos de aborto recebidos pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras em um período de 10 anos e de fetos abortados necropsiados no período de 2011 a 2013. Dos 60 fetos analisados em 30 (50%) foi possível observar lesões microscópicas. Destes, oito possuíam lesões compatíveis com agentes bacterianos e três apresentaram lesões sugestivas de agentes virais. Dos abortos bacterianos um feto

apresentou lesões compatíveis com leptospirose caracterizada por icterícia, nefrite intersticial, nefrose tubular e bilestase. Seis fetos apresentaram pneumonia ou broncopneumonia purulenta sendo que em um deles havia ainda, pleurite e peritonite fibrinosa. Destes seis fetos, em dois, houve imunomarcção para *Brucella abortus*. Em quatro fetos provenientes do estudo retrospectivo não foi possível chegar ao agente etiológico, uma vez que estes foram negativos na IHQ para *Brucella* sp. O oitavo feto foi positivo em provas microbiologia para *Staphylococcus* sp. Já dos três fetos com lesões sugestivas de aborto viral somente em um ocorreu marcação imuno-histoquímica anti-herpesvírus bovino. Os resultados demonstram que os abortos de origem bacteriana e virais, apesar de menos frequentes, continuam ocorrendo e que medidas profiláticas devem ser revistas nas propriedades. Também, demonstrou que IHQ associada a histopatologia, pode ser uma ferramenta viável para o diagnóstico quando provas microbiológicas ou sorológicas não estão disponíveis.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: brucelose, *Leptospira*, *Staphylococcus*, animais de produção, IHQ.

INTRODUÇÃO

A pecuária desempenha um papel importante na economia do Brasil, sendo que, as doenças que cursam com perdas reprodutivas, sempre resultaram em um custo substancial para o produtor. Nos rebanhos brasileiros, em função da diversidade de criação e, muitas vezes, pela falta de informação de alguns produtores ou ausência de um suporte laboratorial, nem sempre é possível chegar a um diagnóstico definitivo. Sendo assim, em muitas regiões pouco se conhece sobre a frequência dos agentes causadores de aborto.

Entre as diversas etiologias, destacam-se as de origem infecciosas. Estas são subdivididas em abortos por protozoários, bacterianos, virais ou fúngicos. Os bacterianos são frequentemente associados à *Brucella abortus*, *Leptospira* spp, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. Já os de origem viral ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (VDVB) e Herpesvírus Bovino tipo I (HVB-1) (Varaschin & Wouters 2006).

O Herpesvírus bovino tipo 1, pode estar associado a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa, balanopostite pustular infecciosa e a casos de abortos (Franco e Roeche 2007). Nestes as lesões macroscópicas geralmente estão ausentes ou mascaradas por autólise (Schlafer 2007). Porém, microscopicamente podem ocorrer áreas de necrose no fígado (Kennedy e Richards 1964), baço, timo, linfonodos, pulmão, rim e placenta (Antoniassi et al. 2007). O diagnóstico imuno-histoquímico pode ser utilizado, principalmente quanto somente os tecidos fetais formolizados estão disponíveis (Kirkbride 1992).

A infecção pelo VDVB está associada a várias formas de manifestação clínica, incluindo a diarréia viral, doença das mucosas, doença do complexo

respiratório bovino, abortos, efeitos teratogênicos no feto, síndrome do bezerro fraco e infecção hiperaguda com alta morbidade e mortalidade (Baszler et al. 1995). Mais recentemente uma síndrome chamada de pancitopenia neonatal bovina, que cursa com trombocitopenia e marcada destruição da medula óssea em bezerras, foi associada a uma vacina da BVD (Laming et al. 2012).

As lesões microscópicas, causadas pelo vírus da Diarréia Viral bovina, em fetos, são inespecíficas. Podem ocorrer miocardite não específica (Grooms et al. 2002) e infiltrado inflamatório mononuclear tanto peribronquiolar quanto interalveolar (Murray 1991). Quando são afetados no segundo trimestre da gestação os fetos podem apresentar malformações como hipoplasia de cerebelo, timo e/ou pulmonar, catarata, hidrocefalia, bragnatia, além de anormalidades ósseas (Grooms et al. 2002). O diagnóstico de DVB pode ser feito pela demonstração, por técnica de imuno-histoquímica, de antígenos virais em várias amostras de tecidos fetais (Antoniassi et al. 2007, Nelson et al. 2008), pela imunofluorescência e PCR (Antoniassi et al. 2007).

Em relação às principais bactérias causadoras de aborto, são descritas como agentes mais frequentes a *Brucella abortus* (Almeida et al. 2004) e a *Leptospira* sp (Szeredi & Haake 2006).

Na brucelose macroscopicamente podem se observar lesões na placenta, útero gravídico e raramente em fetos, mesmo assim, essas lesões não são patognomônicas. No feto o órgão mais frequentemente afetado é o pulmão, podendo apresentar uma pleurite fibrinosa, sem necessariamente ocorrer o envolvimento do parênquima pulmonar (Xavier et al. 2009). Este órgão também pode apresentar-se com aumento de consistência e espessamento de septos interlobulares. Inflamações fibrinosas podem ocorrer no pericárdio e peritônio (Carvalho Neta et al. 2010). Microscopicamente podem ocorrer pleurite fibrinosa, bronquite (Enright & Samartino 1994, Xavier et al. 2009, Carvalho Neta et al. 2010), broncopneumonia supurativa (com acúmulo de macrófagos e neutrófilos) (Enright & Samartino 1994, Pérez et al. 1998, Xavier et al. 2009, Carvalho Neta et al. 2010), pneumonia intersticial (Pérez et al. 1998, Carvalho Neta et al. 2010), trombose e arterite necrosante em vasos do pulmão, áreas focais de necrose e formação de granulomas nos linfonodos, baço, rim (Enright & Samartino 1994), fígado (Enright & Samartino 1994, Pérez et al. 1998). Menos frequentemente, mas também descrita é a ocorrência de meningite multifocal difusa (Hong et al. 1991).

Dentre os métodos utilizados para o diagnóstico de aborto por *Brucella* a imuno-histoquímica demonstra ser uma técnica suficientemente sensível. A imunomarcagem pode ser observada em bactérias presentes no citoplasma de macrófagos do pulmão e fígado. Mas também em alguns neutrófilos e restos celulares presentes no interior dos alvéolos e brônquios (Pérez et al. 1998), assim como, em macrófagos das meninges e plexo coróide (Hong et al. 1991).

A leptospirose também é uma importante causa de aborto e a infecção ocorre mais frequentemente pela *Leptospira interrogans*, sorovar *pomona* e sorovar *hardjo* (Antoniassi et al. 2007). Bovinos são considerados hospedeiros da manutenção da sorovariabilidade Hardjo, pois possuem elevada suscetibilidade à infecção, a transmissão é endêmica entre os animais dessa espécie, apresentando a

doença na forma crônica (Chiareli et al., 2012). A leptospirose tipicamente ocorre após o contato de mucosas com a *Leptospira* resultando numa manifestação clínica suave ou ausente. O aborto geralmente ocorre no último trimestre de gestação após uma fase de septicemia (Grooms 2006). Macroscopicamente, os fetos podem apresentar grau avançado de autólise, sem se observar alterações específicas. Contudo, podem ocorrer leve a moderado grau de icterícia, aumento de volume do fígado (que pode apresentar-se também amarelado), baço e linfonodos mediastínicos. Já na microscopia os rins podem apresentar suave à severa tubulonefrose, vasculite, perivasculite, nefrite intersticial linfo-histiocítica e hemorragia aguda. No fígado pode estar presente necrose multifocal, infiltrado de linfócitos, histiócitos e neutrófilos no parênquima e tríades portais, degeneração vacuolar dos hepatócitos e colestase. No pulmão pode ocorrer vasculite linfo-histiocitária e trombose nos vasos sanguíneos. Vasculite discreta no coração, baço, e cérebro (Szeredi & Haake 2006).

Para o diagnóstico de leptospirose nos fetos, colorações especiais como Warthin-Starry podem ser utilizadas para demonstrar a presença das leptospiras em vários tecidos fetais e placenta. Porém, muitos tecidos podem não ser positivos nas colorações pela prata. Desta forma a imuno-histoquímica tem sido utilizada para a detecção deste agente com grande eficiência em várias espécies animais (Szeredi & Haake 2006). Quando o a IHQ não está disponível, provas sorológicas, como o teste de microaglutinação (MAT) podem ser realizados no rebalho (Chiareli et al, 2012).

O estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de leite do Brasil, com aproximadamente 25,6% da produção nacional, sendo que a região de estudo pertencente a uma grande bacia leiteira do Sul de Minas Gerais, contribui juntamente com a região sudeste com aproximadamente 18% da produção do estado (IBGE, 2012) e conseqüentemente as doenças que cursam com aborto, podem causar um impacto significativo na economia da região.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a freqüência e descrever as principais lesões encontradas nos abortos bovinos causados por agentes virais e bacterianos no sul de Minas Gerais, assim como avaliar a eficiência da imuno-histoquímica no diagnóstico, uma vez que muitas vezes é a principal técnica disponível numa rotina de diagnóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem e característica das amostras

O material de estudo foi proveniente de fetos bovinos necropsiados nos anos de 2011 a 2013 (estudo prospectivo) e de uma análise retrospectiva de 10 anos de casos de aborto bovino recebidos pelo Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil.

Para a obtenção do histórico dos fetos, recebidos entre os anos de 2011 e 2013, era realizada uma anamnese com os proprietários e/ou veterinários, para coleta de dados sobre manejo e profilaxias. A idade fetal foi determinada por meio

de registros de cobertura dos animais, fornecidos pelos proprietários, associado à mensuração do feto durante a necropsia conforme recomendado por Barr et al. (1990).

Durante a necropsia, amostras de tecidos, como, o sistema nervoso central (córtex dos hemisférios cerebrais e do cerebelo, tálamo, colículo rostral e caudal, pedúnculos cerebelares, óbex e medula cervical, torácica e lombar), músculos esqueléticos (occipital, semitendinoso, semimembranoso, infraespinhal, diafragma e língua), coração, esôfago, pulmão, fígado, rim, baço, linfonodos mesentéricos, intestinos, timo, válvula íleo-cecal, ovário/testículo, útero, pele, rúmen, retículo, omaso, abomaso e glânglio trigeminal, foram coletados em formalina a 10% tamponada e processados rotineiramente para histopatologia. Cortes de 5µm de espessura foram corados pela Hematoxilina e Eosina e avaliados mediante microscopia ótica.

No estudo prospectivo foram coletadas amostras de pulmão e líquido abomasal, separadamente em *ependorfs* autoclavados. Esse material era coletado logo após a abertura da cavidade abdominal ou torácica por meio de agulha e seringa ou bisturi estéril e encaminhados para cultivo bacteriológico.

Histoquímica e Imuno-histoquímica

Os tecidos dos fetos que apresentassem lesões compatíveis com aborto bacteriano ou viral eram submetidos a marcação imuno-histoquímica com anticorpos específicos. Fetos suspeitos de aborto pela *Leptospira* sp foram submetidos colorações histoquímicas pela impregnação pela prata (Wartin-Starry). Assim como o soro das vacas que abortaram foram encaminhados ao Laboratório de Leptospirose da UFMG para realização de Teste de Microaglutinação (MAT) para vários sorovares como auxílio diagnóstico.

Para imuno-histoquímica, os cortes histológicos em lâminas silanizadas, após desparafinados e rehidratados, foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena por meio de peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. Caso a suspeita fosse de Herpesvírus bovino tipo 1, a recuperação antigênica era realizada através da digestão enzimática por proteinase K (Dako, Carpinteria, CA) por 15 minutos a temperatura ambiente. Já em abortos suspeitos de *Brucella* sp e pelo vírus da Díarria Viral Bovina a recuperação antigênica foi realizada por meio de digestão enzimática com tripsina 0,1% (pH 7,8) por 10 minutos a 37°C, seguida pela recuperação pelo calor por 2 minutos no tampão citrato (pH 6,0). Para o bloqueio de reações inespecíficas, os cortes foram submergidos em solução de leite desnatado (Molico®, Nestlé) diluído em TRIS a 5% por uma hora. Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário policlonal anti-*brucella* (gentilmente cedido pelo professor Renato Lima, UFMG) por 30 minutos a 37°C, com o anticorpo monoclonal anti-Herpesvírus bovino tipo 5 (clones 2F9.E9 e 4E4) (produzido e gentilmente cedido pelo professor Eduardo Flores e que possui marcação cruzada com o HVB-1, conforme Oldoni et al., 2004) *overnight* a -4°C ou com o anticorpo monoclonal anti-BVDV (D89,VRMD, Inc., Pullman, USA) por duas

horas a 37°C. A diluição destes anticorpos em TRIS foram de 1:500, 1:50 e 1:50 respectivamente. As lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Dako, Carpinteria, CA), seguidos do complexo avidina-biotina peroxidase (Dako), ambos por 20 minutos na temperatura ambiente. Na revelação utilizou-se o cromógeno Vector Red (Vector NovaRed®) no tempo de 1 a 5 minutos, e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina. Como controle positivo para Herpesvírus foi utilizado amostras de bovino acometido por encefalite por herpesvírus bovino tipo 5, para BVD e brucelose foram utilizados amostras de animais necropsiados na rotina laboratorial em que houve confirmação destes agente por outros métodos de diagnóstico e IHQ. Em todas as passagens as lâminas foram lavadas em PBS e TRIS.

Cultivo Microbiológico

Amostras de pulmão e líquido abomasal foram repicadas em meio TSA (Ágar Triptona de Soja) e Ágar Sangue com o auxílio de uma alça estéril atrás de uma chama. Assim, devidamente identificadas com o número do feto e material correspondente, as placas de Petri eram encaminhadas para uma estufa a 37°C onde permaneciam por um período de 24 a 48 horas. Passado o período de incubação, era verificado se essas placas continham apenas um tipo de cultura. Caso houvesse contaminação (dois ou mais crescimentos bacterianos), cada agente era repicado novamente, de forma individual, em placas e incubadas a 37°C. Quando a cultura encontrava-se pura eram realizados testes microbiológicos básicos (Catalase, Oxidase, KOH) todos com o intuito de dar início à identificação do agente bacteriano isolado. Posteriormente eram armazenadas em meio de congelamento, em duplicata a -20°C.

Identificação de agente bacteriano

Os tecidos dos fetos com lesões compatíveis com agentes bacterianos eram submetidos a marcação IHQ contra *Brucella* sp. Aqueles que resultassem negativas na IHQ, alíquotas de 10 µL do meio de congelamento, com a bactéria anteriormente isoladas, eram colocadas em tubos de ensaios contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) e levados à estufa 37°C por no mínimo 24 horas. Ao se tornar opaco, indicando crescimento bacteriano, com auxílio de uma alça estéril, uma amostra desse líquido era repicado em placas de Petri contendo o meio TSA (Trypticase Soy Agar) e novamente encaminhados à estufa a 37°C onde permaneciam por mais 24 horas. Posteriormente, essas placas foram encaminhadas, resfriadas, para o Laboratório de Bacterioses da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para a realização provas de triagem e de PCR para identificação do agente.

RESULTADOS

De 60 fetos estudados em 51 deles a origem da região sul de Minas Gerais foi confirmada e destes, somente 30 fetos (50%) apresentaram lesões microscópicas. Três fetos apresentaram lesões compatíveis com aborto por vírus e oito fetos apresentaram lesões compatíveis com aborto bacteriano. Os 19 fetos (63%), não descritos nesse trabalho foram diagnosticados como aborto por *Neospora caninum*.

Histórico clínico, teste sorológico e lesões macroscópicas

Do histórico dos três fetos com suspeita de aborto por vírus, consta que, uma das propriedades já teve anteriormente problemas de aborto, onde foi diagnosticado como de origem viral, sendo que, o problema havia sido resolvido mediante vacinação das vacas. Porém, esta vacinação contra HVB/BVD havia cessado há mais de dois anos, ocorrendo novamente os casos de aborto. Nas outras duas propriedades os animais não eram vacinados pra HVB/BVD. Na necropsia, o feto oriundo da primeira propriedade, não apresentou lesões macroscópicas. Os dois fetos restantes apresentaram bragnatia sendo enquadrados na supeita de aborto por VBVD.

Alguns fetos foram encaminhados sem histórico clínico. Lesões macroscópicas foram observadas em três dos oito fetos diagnosticados como aborto de origem bacteriana. No feto 5 observou-se pequena quantidade de líquido translúcido na cavidade abdominal (300 ml) e torácica (600 ml).

O feto 8 apresentou grande quantidade de líquido avermelhado na cavidade abdominal (aproximadamente 1,5 litros) e na cavidade torácica (aproximadamente 1 litro). Neste mesmo feto, a pleura pulmonar (Fig. 1), omento e alças intestinais (Fig. 2) encontravam-se recobertas por uma espessa camada de fibrina com aderência em alguns pontos da pleura visceral a parietal.

O feto 9, era o único com um histórico disponível. As vacas haviam recebido vacina comercial contra leptospira em outubro de 2012. Nesta propriedade por um erro no manejo do sistema hidráulico o esterco (chorume) entrou no reservatório de bebida dos animais, com o início dos abortos após esse episódio. Na necropsia o feto apresentou icterícia discreta (Fig. 3), fígado aumentado de volume (Fig.4), vermelho amarelado e petéquias multifocais no timo (Fig. 5). As vacas que estavam abortando apresentaram reações positivas anti-*Leptospira* sorovar Hardjo no teste de microaglutinação (MAT). Foram consideradas positivas os soros diluídos a partir de 1:100 para sorovar Hardjo, quando no campo microscópico apresentaram no mínimo 50% ou mais de leptospiros aglutinadas, conforme descrito por Chiareli et al., (2012). As vacas que abortaram apresentaram 75% de leptospiros aglutinadas para a Sorovariedades Hardjo genótipo Hardjobovis e Hardjoprajitino (amostra Bolívia isolada em rebanho mineiro conforme Chiareli et al., 2012) e Hardjo O.M.S (amostra de referência).

Lesões microscópicas e marcação imuno-histoquímica em fetos suspeitos de aborto a vírus

Em todos os fetos cuja principal suspeita foi de aborto por vírus, observou-se moderada quantidade de células fragmentadas nos acúmulos linfóides, como timo, válvula ileocecal, linfonodos e baço (Fig. 6).

Nos dois fetos com bragnatia e nos controles negativos (fetos sem lesão) não ocorreu marcação. A imunomarcação ocorreu apenas no feto 6 proveniente de propriedade com histórico de aborto viral, e somente com o anticorpo monoclonal anti-herpesvírus bovino tipo 5, cepa 4E4. Esta ocorreu no citoplasma de células do baço (Fig. 7 e 8), linfonodos mesentéricos, células de Kupffer, em macrófagos pulmonares, e no citoplasma de neurônios do tálamo (Fig. 9). No colículo caudal ocorreu a imunomarcação de células endoteliais de vasos sanguíneos (Fig. 10). Os outros dois fetos foram negativos na IHQ para VDVB e herpesvírus.

Lesões microscópicas e marcação imuno-histoquímico em fetos suspeitos de aborto bacteriano

Dois abortos bacterianos foram provenientes do estudo retrospectivo (fetos 1 e 10) e seis do estudo prospectivo (fetos 2, 5, 7, 8, 9, 10). Dois fetos (feto 1 e 8), apresentaram lesões compatíveis com brucelose a qual foi posteriormente comprovada pela marcação IHQ. No feto 8 foi observada uma pleurite fibrinosa acentuada (Fig. 11) composta por grande quantidade de células mononucleares e fibrina, e na luz alveolar pequena quantidade de neutrófilos. Também podia ser observada meningite composta predominantemente por células mononucleares (Fig 12) (linfócito e macrófagos) e raros neutrófilos na região do córtex, tálamo, cerebelo e medula cervical. Na serosa do abomaso, fígado, gordura mesentérica, intestino delgado e intestino grosso foi observado um infiltrado inflamatório mononuclear acentuado e difuso, onde este em alguns pontos, aprofundava-se até a submucosa do abomaso, intestino delgado e grosso. Na marcação IHQ visualizou-se bactérias na forma de coco-bacilos no citoplasma das células inflamatórias, principalmente macrófagos, da pleura pulmonar (Fig. 13), meninges, serosa intestinal e linfonodos mesentéricos.

O feto 1, apresentou microscopicamente broncopneumonia necrotizante multifocal, caracterizada por um discreto a moderado infiltrado inflamatório constituído por macrófagos e neutrófilos no interstício pulmonar, associado a pouca quantidade de fibrina e necrose de células inflamatórias no interior de alvéolos e brônquios (Fig. 14). Na IHQ a marcação ocorreu em meio a restos celulares presentes na necrose pulmonar (Fig.15) e no citoplasma de macrófagos.

No feto 10, negativo na IHQ para *Brucella* sp e classificado somente como aborto bacteriano, observou-se uma pneumonia purulenta difusa acentuada (Fig. 16), caracterizada por intenso infiltrado neutrofilico, moderado de macrófagos e raros filetes de fibrina na luz dos alvéolos. Este infiltrado era observado nos septos lobulares associados a focos de hemorragia. Nos linfonodos havia a presença de macrófagos nos seios medulares.

Nos fetos 2 e 7, observou-se apenas a presença de infiltrado neutrofilico e células mononucleares associadas a filetes de fibrina na luz dos brônquios e alvéolos, sendo que, no feto 2 havia bactérias, na forma de cocos no pulmão.

No feto 5, onde mediante cultivo microbiológico foi isolado *Staphylococcus* sp, o pulmão continha grande quantidade de neutrófilos, alguns macrófagos e moderada quantidade de fibrina nos brônquios, bronquíolos e alvéolos. Associado a esse infiltrado, encontravam-se colônias bacterianas em forma de cocobacilos (Fig. 17). Estas colonias tendiam a se aderir na superfície de algumas células inflamatórias. O infiltrado de neutrófilos e macrófagos também foi observado no timo e sinusóides hepáticos.

Somente um animal foi compatível com leptospirose, o feto 9. Neste, microscopicamente, foram visualizadas no rim, nefrite intersticial mononuclear (Fig. 18 e 19) multifocal moderada, vacuolização do citoplasma das células do epitélio tubular, com focos de necrose no túbulo contorcido proximal, pigmento marrom no citoplasma do epitélio tubular. No fígado foi observada dissociação de hepatócitos e infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e macrófagos periportais. Além de acentuada biliestase em interior de canálculos biliares e de hepatócitos (Fig. 20). Outras áreas, como timo, pulmão e córtex cerebral, apresentavam focos de hemorragia. O pulmão com discreto espessamento de septo e neutrófilos nos capilares alveolares. Na impregnação pela prata não foi possível identificar estruturas compatíveis com *Leptospira* sp.

Identificação de Bactérias

Dezesseis bactérias em meio de congelamento foram encaminhadas para identificação, ao laboratório de Bacterioses da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais (UFMG). Estas eram proveninetes de três fetos. Em todos, exceto o feto 5, cresceram somente bactérias consideradas contaminantes. No feto 5 houve o crescimento de *Staphylococcus* sp.

DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo demonstram a dificuldade de se chegar ao diagnóstico etiológico nos casos de aborto. Tanto fetos com lesões sugestivas abortos bacterianos (8 casos) como virais (3 casos) chegou-se no diagnóstico etiológico em 45% deles, devendo-se levar em conta que em dois casos dos abortos bacterianos e um dos virais eram provenientes do estudo retrospectivo, com apenas material em parafina disponível para o diagnóstico. Segundo Kirkbride (1990) somente 30% a 40% dos fetos bovinos abortados apresentam um diagnóstico etiológico. Estes resultados também são descritos por Cortez et al., (2006), dentre 114 fetos, encaminhados para diagnóstico laboratorial, e onde pesquisou-se pela PCR a presença de ácidos nucleicos do VDVB, HVB, *Brucella* spp. e *Leptospira* spp, em 77,4% da amostras não foi possível detectar nenhum dos agentes estudados. Somado a isso, muitos fetos são encaminhados autolizados ou congelados, dificultando, o isolamento do agente.

A principal lesão do feto diagnosticado como aborto por herpesvírus foi a ocorrência de fragmentação de células linfóides do timo, válvula ileocecal, linfonodos e baço. Achados compatíveis aos descritos para aborto por herpesvírus bovino tipo 1, com necrose linfóide com depleção secundária (Enright et al., 1984, Rodger et al, 2007) assim como, necrose e infiltrado inflamatório mononuclear periportal no fígado, focos de necrose pulmonar e hemorragias na região medular do rim (Rodger et al. 2007).

Oldoni et al. (2004) na produção de anticorpos monoclonais, a partir de isolados de herpesvírus bovino tipo 5, provenientes de amostras de vacas com sintomatologia neurológica do Rio Grande do Sul, observou que nove desses anticorpos tiveram reação cruzada com 10 isolados de Herpesvírus bovino tipo 1. No presente estudo foram usados dois tipos desses anticorpos, onde somente o anticorpo monoclonal 4E4 foi efetivo na imuno-marcação e permitiu o diagnóstico de aborto por herpesvírus. Essa marcação ocorreu em vários tecidos, sendo mais significativa no baço. No presente estudo, no controle positivo (bovino com encefalite por herpesvírus bovino tipo 5) ocorreu marcação em todo o neurônio, incluindo seus prolongamentos. Nos fetos testados, observou-se marcação no citoplasma de células intactas de áreas sem e com necrose, assim como em áreas focais do citoplasma de neurônios e em algumas células endoteliais. Semelhante a Crook et al (2012) em abortos por herpesvírus tipo 1 a imunomarcação evidenciou antígenos também em vasos e em todo o citoplasma de neurônios. Estas diferenças, talvez possam ter ocorrido pelo uso de diferentes cepas de vírus. Rodger et al (2007) descreve a marcação imuno-histoquímica em hepatócitos e em células do baço e linfonodos, tanto na região medular como na cortical. Esta marcação nos tecidos linfóides foi semelhante ao encontrado neste estudo.

Em relação aos abortos bacterianos em bovinos, Antoniassi et al. (2013) descreve que a *Brucella abortus* foi responsável por 1,43% da abortos, *Staphylococcus aureus* 1,22% e *Leptospira* 0,6%. No presente estudo a porcentagem encontrada foi maior, sendo, 6,66% para *Brucella* sp, 3,33% para *Leptospira* e 3,33% *Staphylococcus*. O diagnóstico de brucelose foi baseado em lesões macroscópicas e microscópicas. Os principais achados foram pleurite e peritonite fibrinosa em um feto, e broncopneumonia fibrinopurulenta associada a necrose no segundo feto, estes achados são semelhantes aos descrito na literatura (Carvalho Neta 2010, Antoniassi et al. 2013). Os achados de meningite mononuclear com imunomarcação de bactérias, principalmente no citoplasma de macrófagos são mais raros, mas estão de acordo com o descrito por Hong et al. (1991).

O diagnóstico imuno-histoquímico de brucelose baseou-se na presença de partículas finamente granulares de coloração marrom em citoplasma de macrófagos, em alguns neutrófilos e em detritos extracelulares no interior de alvéolos e brônquios, conforme o descrito por Pérez et al (1998) e Carvalho Neta (2010).

Já o diagnóstico de aborto por *Leptospira* sp baseou-se nos achados macroscópicos e microscópicos de nefrite intersticial com focos de tubulonecrose discreta, associado as lesões hepáticas de dissociação dos hepatócito e bilestase.

Lesões estas também descritas na literatura como indicativa de leptospirose (Antoniassi et al. 2013). O fato da *Leptospira* não ter sido visualizada em colorações especiais são justificáveis, pois outras formas da leptospira, como formas curtas e arredondadas, agregados, ou formas cocóides não são detectadas pelas colorações de prata, uma vez que estas são indistinguíveis dos artefatos (Szeredi & Haake 2006). Somado a isso, há a extensa coloração da reticulina e a inabilidade de se reconhecer fragmentos da leptospira, especialmente se poucos organismos estiverem presentes (Wild et al. 2002). Somado a isso os resultados positivos com aglutininas anti-sorovariedade Hardjo e o histórico de aproximadamente 10 meses da última vacinação do rebanho confirmam o diagnóstico, uma vez que, segundo Chiareli et al., (2012) as vacinas anti-leptospiras são imunógenos fracos, gerando resposta imune do tipo humoral, com baixos títulos e por um curto período de tempo. Segundo Grooms et al., (2005), bovinos infectados com a sorovariedade Hardjo frequentemente tem uma pobre resposta de aglutinação de anticorpos em uma infecção, onde os títulos podem ser baixos ou negativos na época do aborto e bovinos infectados e eliminando a leptospira tem títulos de anticorpos anti-Hardjo ≤ 100 .

Nas amostras de pulmão e líquido abomasal, encaminhadas para o exame microbiológico, cresceram bactérias consideradas contaminantes. Somente em um feto houve o crescimento da bactéria *Staphylococcus*, de forma que as lesões apresentadas no feto foram compatíveis com este agente. Estas lesões assemelham-se às descritas por Coberllini et al. (2006), em que se observou inúmeros grupos bacterianos formados por cocos Gram negativos em várias partes do organismo. Este descreve que no pulmão, haviam neutrófilos e células inflamatórias mononucleares associadas às bactérias na luz de bronquíolos e alvéolos. Essas bactérias podem atingir a placenta via hematogena ou via órgãos genitais atingindo o feto por meio da veia umbilical ou líquido amniótico (Miller 1977). O *Staphylococcus spp.* pode ser encontrado no trato genital (Kolev et al. 1983) e em materiais usados na inseminação artificial podendo ser carregadas para o útero e infectar a placenta e o feto (Coberllini et al. 2006).

Os resultados demonstram que agentes virais e bacterianos, apesar de menos frequentes são responsáveis por abortos em bovinos na região estudada. Além disso, as técnicas de histologia e imuno-histoquímica são ferramentas importantes, principalmente quando não se tem acesso a bacteriologia ou as amostras encontram-se muito contaminadas ou formolizadas.

Referências bibliográficas

- Almeida A.C., Santorelli A., Bruzadelli R.M.Z. 2004. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56: 275-276.
- Antoniassi N. A. B, Santos A.S., Oliveira E.C., Pescador C.A., Driemeier D. 2007. Diagnóstico das causas infecciosas de aborto em bovinos. Biológico. 2: 69-72.
- Antoniassi N.A.B., Juffo G.D., Santos A.S., Pescador C.A., Luis G. Corbellini L.G., Driemeier D. 2013. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de

- Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. Pesquisa Veterinária Brasileira. 33:155-160.
- Barr B.C., Anderson M.L., Blanchard P.C., Daft B.M., Kinde H., Conrad P.A. 1990. Bovine Fetal Encephalitis and Myocarditis Associated with Protozoal Infections. *Vet Pathol.* 27:354-361.
- Baszler T.V., Evermann J.F., Kaylor P.S., Byington T.C., Dilbeck P.M. 1995. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet. Path.* 32: 609-618.
- Carvalho Neta A.V., Mol J.P.S., Xavier M.N., Paixão T.A., Lage A.P., Santos R.L. 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal* 184: 146-55.
- Chowdhury S.I. 1995. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology* 213: 558-568.
- Corbellini L.G., Pescador C.A., Frantz F.J., Cardoso M., Driemeier D. 2006. *Staphylococcus* spp. Abortion: Skin Lesions Caused by *Staphylococcus aureus* Infection in an Aborted Bovine-Fetus. *Veterinary Research Communications*. 30: 717-721.
- Crook T., Benavides J., Russell G., Gilray J., Maley M., Willoughby K. 2012. Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of hematogenous spread within the fetus in natural cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24: 662-670.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F., Rock D.L. 2003. Genome of Bovine Herpesvirus 5. *Journal of Virology*. 77: 10339-10347.
- Enright F. M., Samartino L. 1994. Mechanism of abortion in *Brucella abortus* infected cattle. *Proceeding, annual meeting of the United States Animal Health Association*. 5: 88-95.
- Enright F. M., Walker J.V., Jeffers G., Deyoe B.L. 1984. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. *American Journal of Veterinary Research*. 45: 424-430.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehe P.M., Alfieri A.A., Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. *Pesqui. Vet. Bras.* 25: 125-134.
- Franco A.C., Roeche P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E.F.(Ed), *Virologia Veterinária*. Editora UFSM: Santa maria, 2007. 350p.
- Grooms D.L., Baker J.C., Ames T.R. 2002. Diseases caused by bovine virus diarrhoea virus, p.707-714. In: SMITH, B.P. (3 ed). *Large Animals Internal Medicine: diseases of horses, cattle, sheep and goats*. Mosby, St. Louis, MO.
- Hong C. B., Donahue J.M., Giles R.C. Jr., Poonacha K.B., Tuttle P.A., Cheville N.F. 1991. *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Veterinary Pathology*. 28: 429-496.
- Kennedy, P.C.; Richards, W. P. C. 1964. The Pathology of Abortion Caused by the Virus of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Pathology Veterinary*. 2: 7-17.
- Kirkbride C.A. 1992. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Columbia*, v. 4, p.374-379.

- Kolev V., Venev S., Markarian M., Dabev I. 1983. Intrauterine bacterial and mycotic infections in cows. *Veterinary Medicine of Nauki*. 20: 33-40
- Laming E., Melzi E., Scholes S.F., Connelly M., Bell C.R., Ballingall K.T., Dagleish M.P., Rocchi M.S., Willoughby K. 2012. Demonstration of early functional compromise of bone marrow derived hematopoietic progenitor cells during bovine neonatal pancytopenia through *in vitro* culture of bone marrow biopsies. *BMC Research Notes*. 5: 599-602.
- Miller, R.B. 1977. A summary of some of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion. *Canadian Veterinary Journal*. 18: 87-95.
- Murray R.D. 1991. Lesion in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Archives of virology – Supplementum*. 3: 217-224.
- Nelson D.D., Dark M.J., Bradway D.S., Ridpath J.F., Call N., Haruna J., Rurangirwa F.R., Evermann J.F. 2008. Evidence for Persistent *Bovine Viral Diarrhoea Virus* Infection in a Captive Mountain Goat (*Oreamnos Americanus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:752-759.
- Oldoni I., Weiblen R., Inkelmann M.A., Flores E.F. 2004. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37: 213-22.
- Pérez J., Quezada M., López J., Casquet O., Sierra M.A., Martín de las Mulas J. 1998. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10:17-21.
- Rodger S. M., Murray J., Underwood C, Buxon D. 2007. Microscopical Lesions and Antigen Distribution in Bovine Fetal Tissues and Placentae Following Experimental Infection with Bovine Herpesvirus-1 during Pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*. 137: 94-101.
- Schlafer D.H., Miller R. B. 2007b. Female genital system. In: Maxie, M.G. (Ed), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Elsevier, Saunders, Philadelphia. 3: 429-564.
- Szeredi L., Haake D.A. 2006. Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. *Vet. Path.* 43: 755-761.
- Varaschin M.S., Wouters F. *Patologia Especial das Principais Doenças Transmissíveis na reprodução de bovinos: Lavras, 2006*. 52p.
- Wild C.J., Greenlee J.J., Bolin C.A., Barnett J.K., Haake D.A., Cheville N.E. 2002. An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using anti-leptospiral antibodies on renal tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 20-24.

FIGURAS E TABELAS:

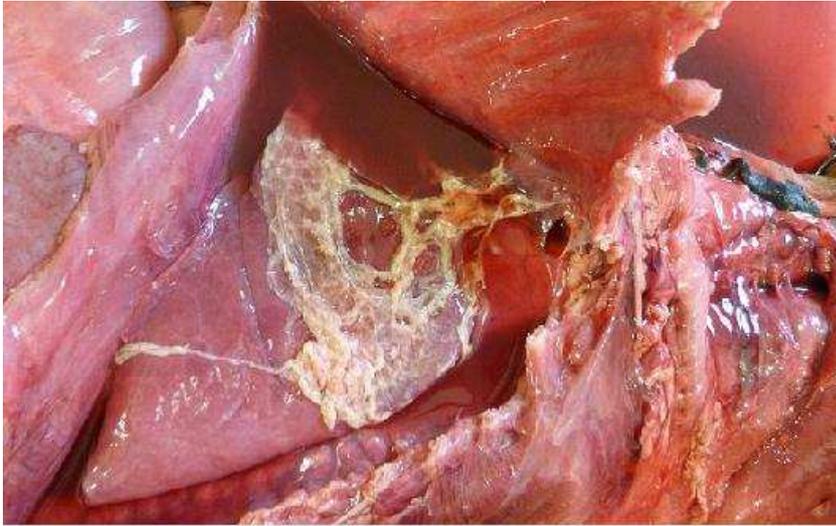


Fig. 1. Brucelose. Cavidade torácica de feto bovino. Presença de líquido avermelhado e espessa camada de fibrina envolvendo o pulmão.

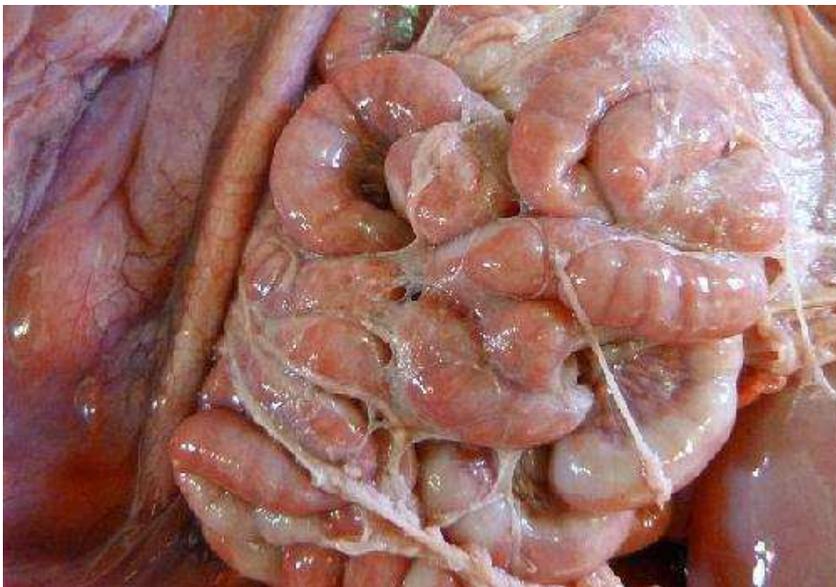


Fig. 2. Brucelose. Cavidade abdominal de feto bovino. Omento e as alças intestinais envoltos por uma espessa camada de fibrina.



Fig. 3. Leptospirose. Tecido Subcutâneo de feto bovino apresentando icterícia discreta.

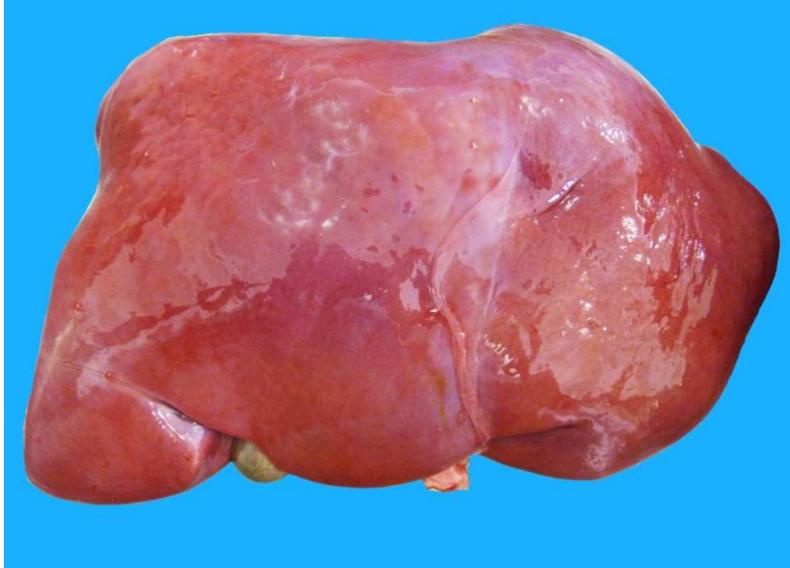


Fig. 4. Leptospirose. Fígado de feto bovino aumentado de volume, com uma coloração mais avermelhada e com algumas áreas amareladas.

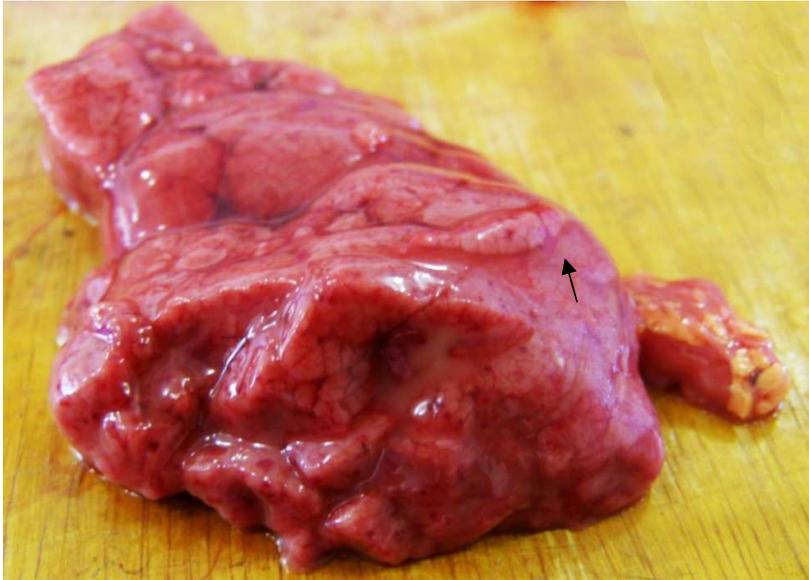


Fig. 5. Leptospirose. Timo de feto bovino apresentando petéquias (seta).

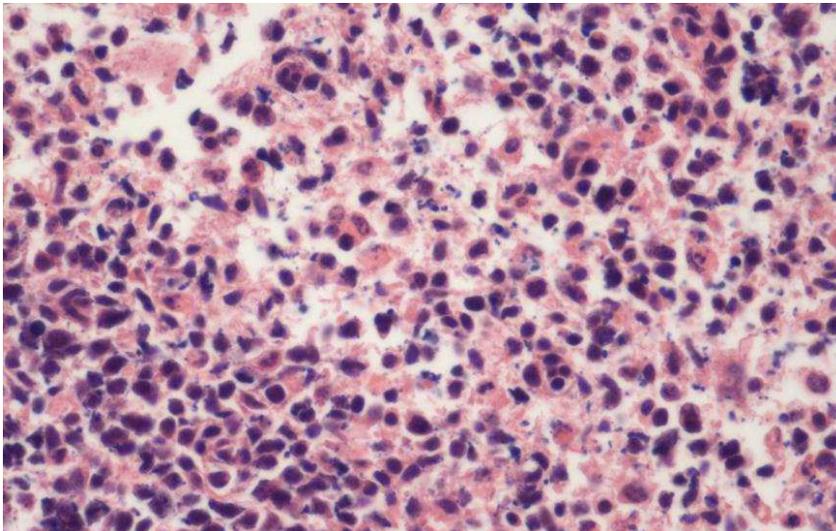


Fig. 6. Herpesvírus bovino tipo 1. Baço de feto bovino apresentando fragmentação de células. Hematoxilina-Eosina. Obj.40.

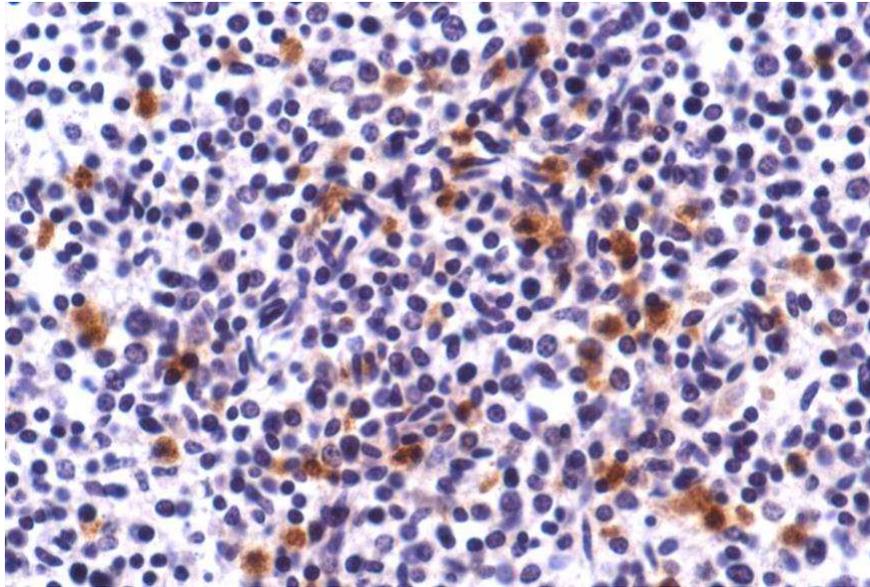


Fig. 7. Herpes vírus bovino tipo 1. Baço de feto bovino. Imunomarcção positiva no citoplasma de células linfóides. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 40.

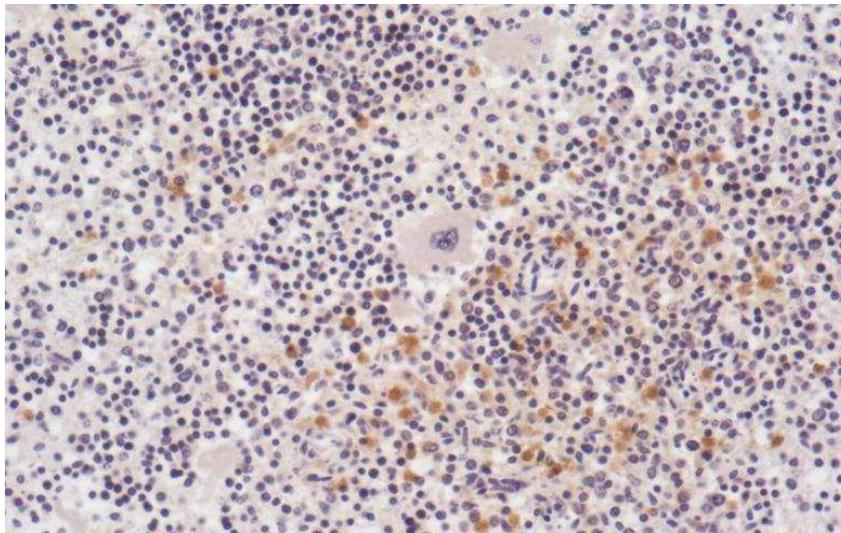


Fig. 8. Herpes vírus bovino tipo 1. Baço de feto bovino. Imunomarcção positiva em células linfóides do baço. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 20.

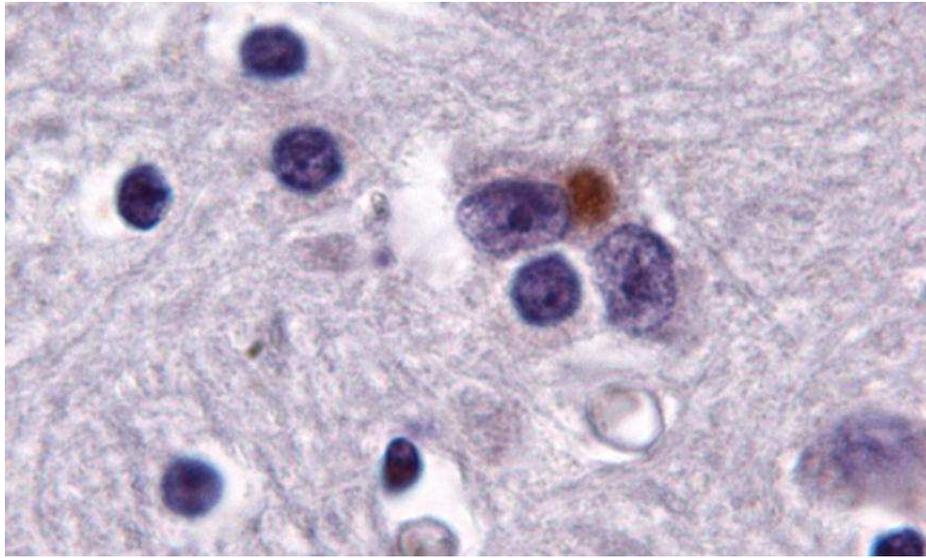


Fig. 9. Herpes vírus bovino tipo 1.. Tálamo de feto bovino com Imunomarcção positiva em neurônios. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj.40.

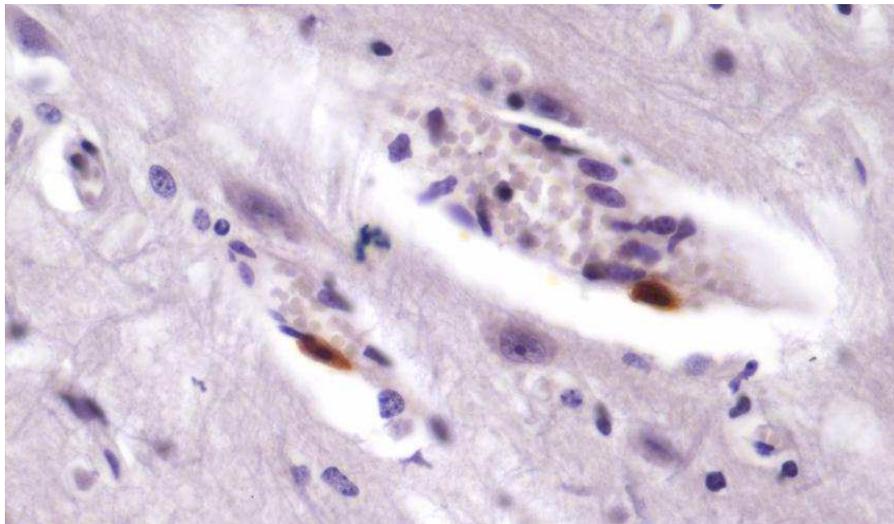


Fig. 10. Herpes vírus bovino tipo 1. Colículo caudal de feto bovino com Imunomarcção positiva no citoplasma de células endoteliais. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 40.

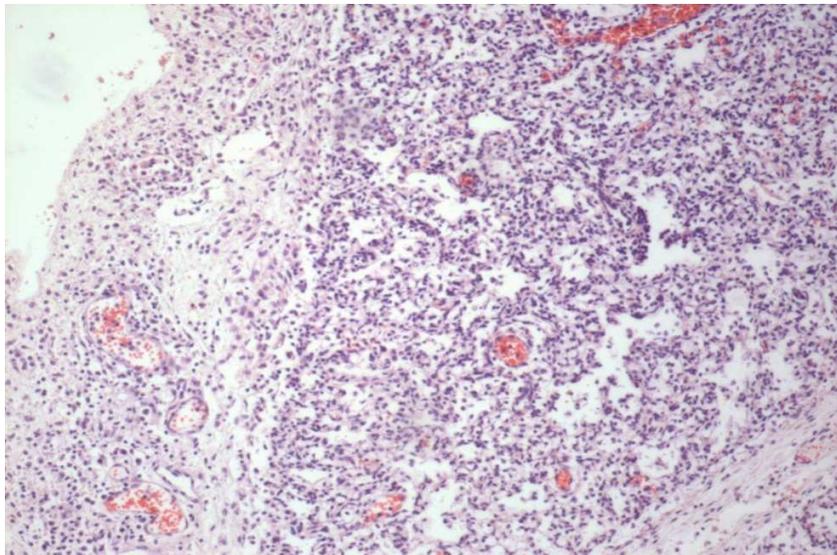


Fig. 11. Brucelose. Pulmão de feto bovino apresentando pleurite fibrinosa. Hematoxilina-Eosina. Obj.20.

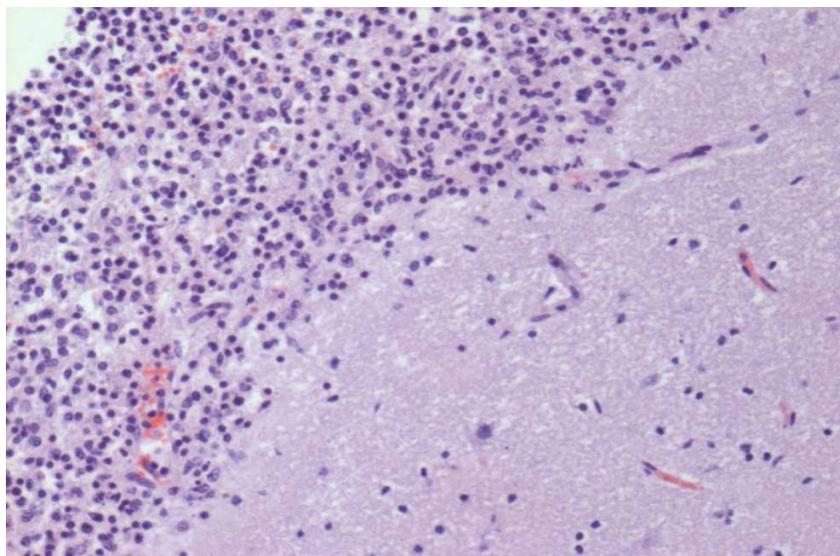


Fig. 12. Brucelose. Meninge de feto bovino apresentando meningite mononuclear acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj.40.

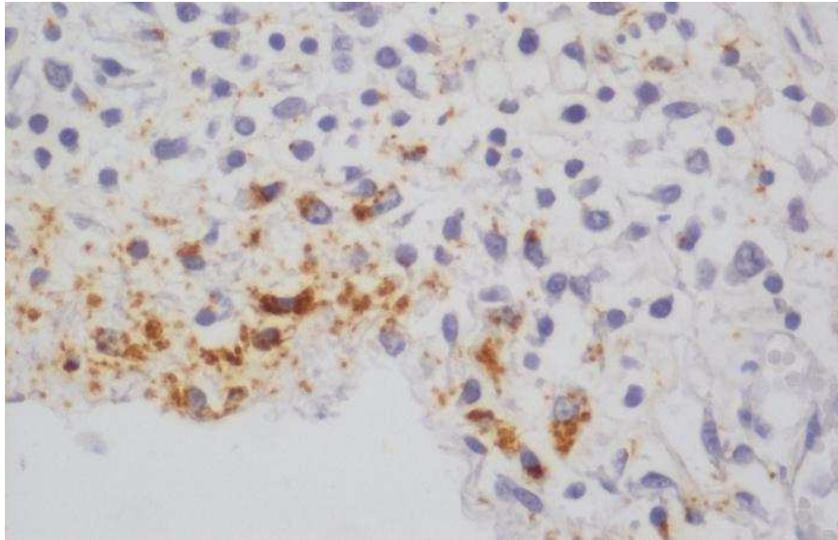


Fig. 13. Brucelose. Imunomarcção positiva para *Brucella abortus* no citoplasma de células inflamatórias presentes na pleura de feto bovino. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj.40.

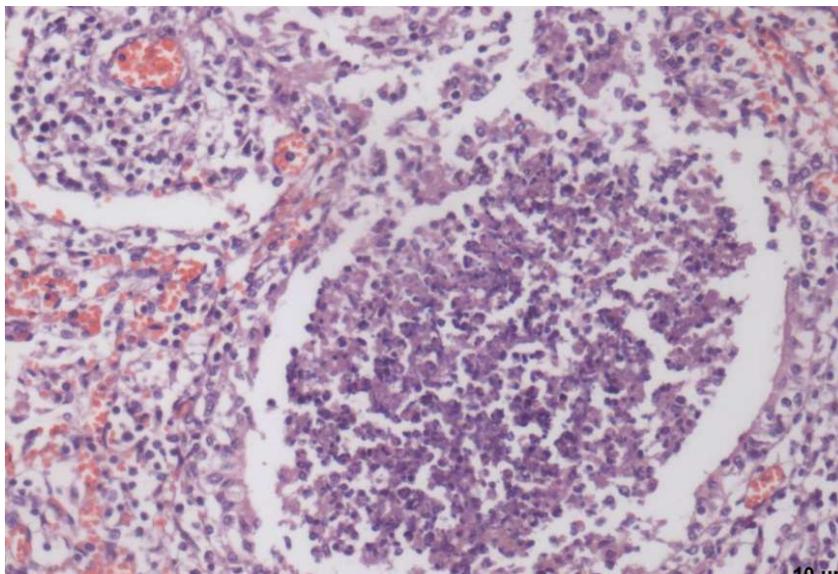


Fig. 14. Brucelose. Pulmão de feto bovino com células necróticas no interior de brônquio e alvéolos. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.

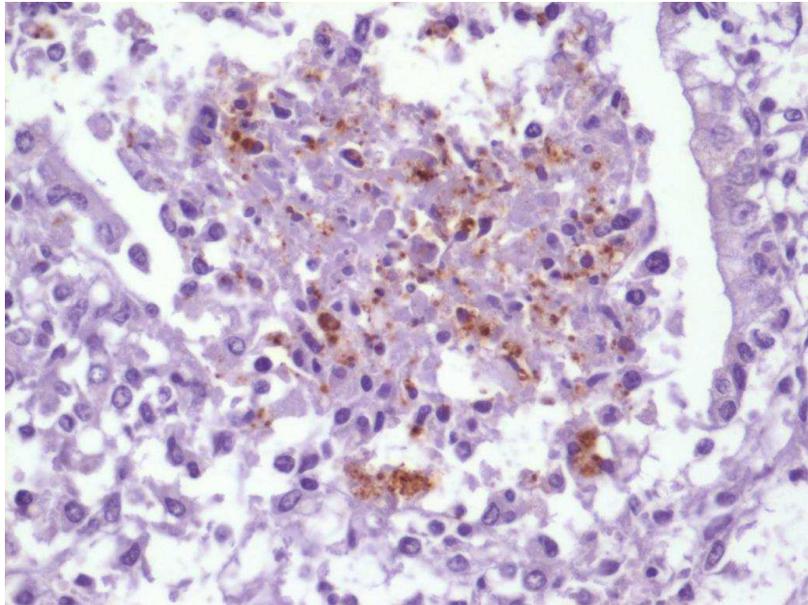


Fig. 15. . Brucelose. Pulmão de feto bovino com marcação positiva de bactérias no citoplasma de macrófagos. Imuno-histoquímica streptavidina biotina. Obj. 40.

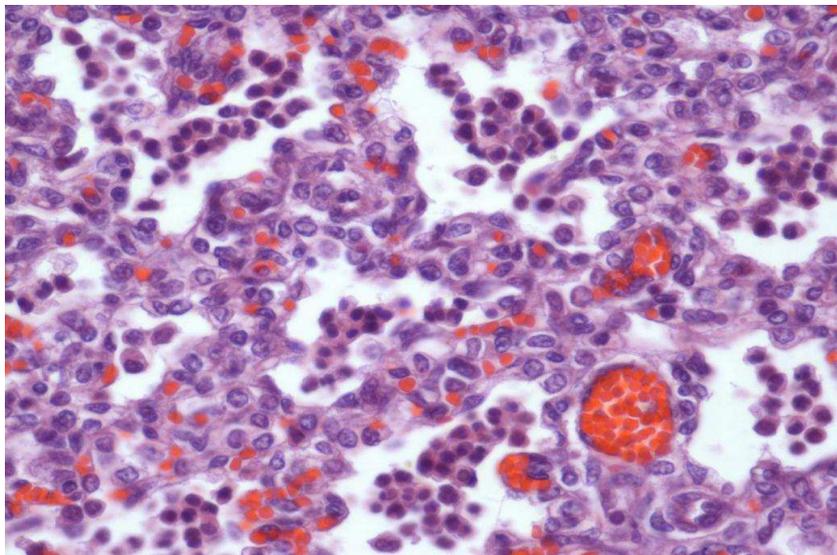


Fig. 16. Aborto bacteriano. Pumão de aborto bovino com pneumonia purulenta difusa acentuada. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.

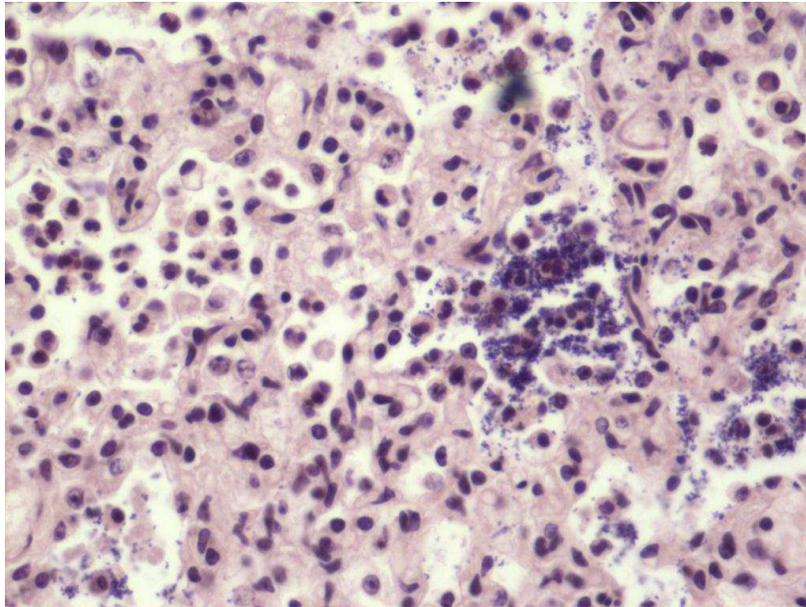


Fig. 17. *Staphylococcus* sp. Pulmão de feto bovino com infiltrado de neutrófilos nos alvéolos e bactérias basofílicas aderidas à superfície dos mesmos. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.

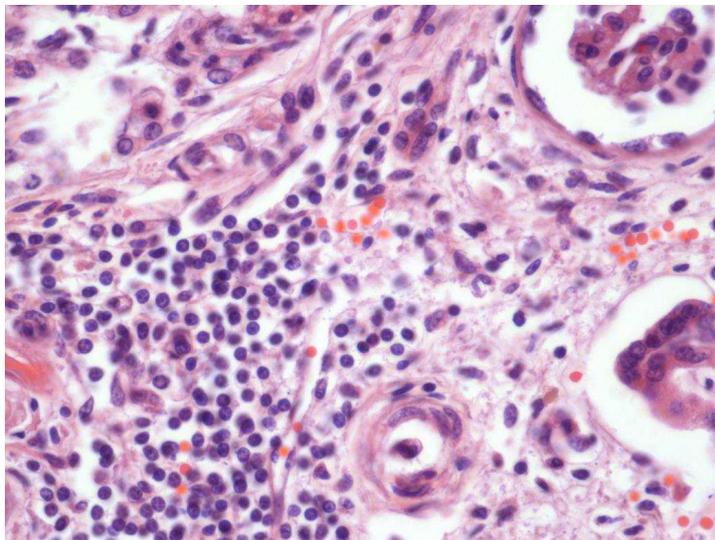


Fig. 18. Leptospirose. Rim de feto bovino com nefrite intersticial mononuclear. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.

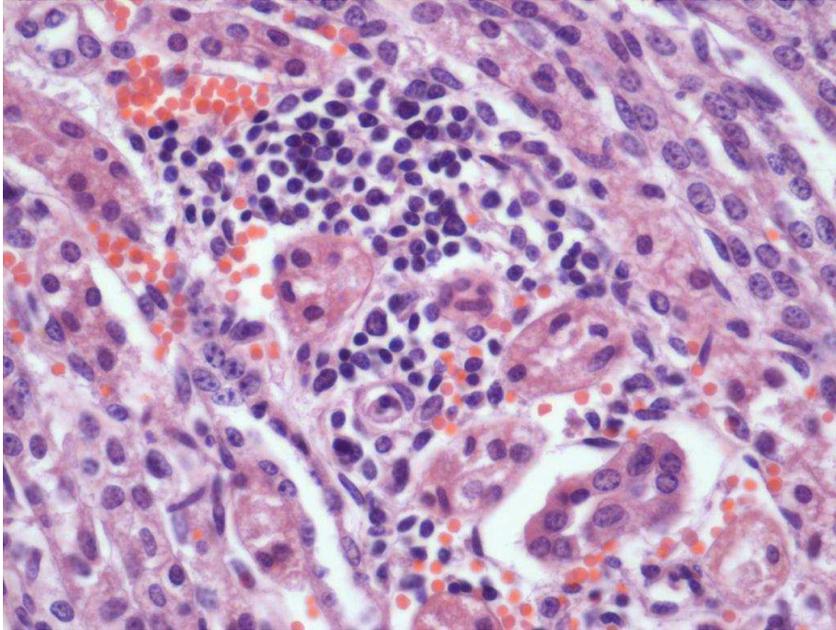


Fig. 19. Leptospirose. Rim de feto bovino Com nefrite intersticial mononuclear. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40x.

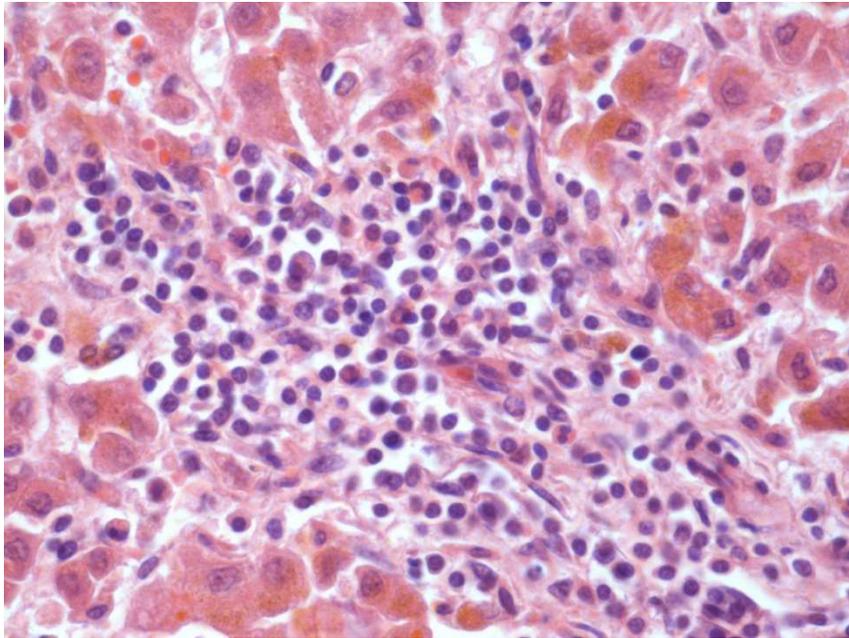


Fig. 20. Leptospirose. Fígado de feto bovino com intenso infiltrado mononuclear e bilestase dentro do citoplasma de hepatócitos. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40.

(VERSÃO PRELIMINAR)