UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Diagnóstico e fatores de risco associados à *Brucella* spp., *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos na microrregião de Floriano, Piauí.

Teresina – Piauí
2016

SILUANA BENVINDO FERREIRA

Diagnóstico e fatores de risco associados à *Brucella* spp., *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos na microrregião de Floriano, Piauí.

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Orientador

Teresina – Piauí

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

F383d Ferreira, Siluana Benvindo
Diagnóstico e fatores de risco associados à *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum* em bovinos na microrregião de Floriano, Piauí / Siluana Benvindo Ferreira 2016.
118 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí,Teresina, 2016.

Orientação: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

1. Diagnóstico (Veterinário) 2. Leptospirose 3. Brucelose 4. Neosporose 5. Piauí I.Título

CDD 636.089 607 5

Diagnóstico e fatores de risco associados à *Brucella* spp., *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* em bovinos na microrregião de Floriano, Piauí.

Aprovado em: 29/04/ 2016

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Carla Cristina Guimarães de Moraes/ UFPA

Membro externo

Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira /UEMA

Membro externo

Profª. Drª Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro - UFPI DCCV/CCA/UFPI
Membro Interno

Profª. Drª Tânia Vasconcelos Cavalcante - UFPI DCCV/CCA/UFPI
Membro interno

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza DCCV/CCA/UFPI
Presidente

EPÍGRAFE

“ ... E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais...”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram possível a realização deste trabalho.

Sou muito grata também às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades eu jamais conheceria.

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 Senhor por permitir alcançar mais um objetivo de vida...

Aos meus pais, **Almir e Ana Cristina**, pelo carinho, amor e apoio em todas as decisões. De modo especial agradeço a minha mãe por ter me ajudado tanto, tanto que me faltam palavras para descrever o que a senhora fez por mim. Tudo que eu posso dizer é que não teria conseguido sem sua ajuda e força...

Ao meu marido, **Joaquim Coêlho**, pela eterna amizade, imenso auxílio conferido durante o Doutorado, pelo carinho, por me fazer feliz nas horas de tristeza, pelo encorajamento em momentos de fraqueza, incentivo, compreensão, cumplicidade e felicidades que junto vivenciamos;

À minha filhinha de quatro patas Jade pelos momentos de alegria e distração.

Aos meus irmãos, **Pablo, Savio e Paula**, eu amo vocês!!!!

À minha família, pelo apoio, amizade e incentivo em cada etapa desta tese e em especial a tia **Francileide**, **Ilaete** e **Zefinha** pela companhia, amizade e pelos conselhos.

Agradeço a tia **Nilce** por participar e me ajudar em toda a minha vida.

Obrigada aos meus primos, em especial, **Michel** e **Cinthia** pelo processamento das

amostras.

Ao Prof. **Dr. José Adalmir Torres de Souza**, primeiro pela confiança ao aceitar me orientar no doutorado, por aceitar que eu desenvolvesse esse projeto, mesmo sem ter certeza se eu conseguiria concluí-lo. Agradeço por tudo que aprendi dentro e fora do laboratório, dentro e fora da sala de aula.

À **Universidade Federal do Piauí**, pela oportunidade da graduação em Medicina Veterinária, do Mestrado em Ciência Animal e agora do Doutorado em Ciência Animal.

Ao **Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal (PPGCA)** que através de sua equipe, muito contribuíram para minha formação profissional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudo durante o curso de Doutorado.

À Agência de Defesa Agropecuária do Piauí (ADAPI) e seus profissionais pela colaboração essencial para que o projeto fosse realizado.

O meu agradecimento em especial ao médico veterinário **Emídio Ferreira Sobrinho (ADAPI)**, por ter sido prestativo e ter depositado a sua confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Aos **produtores** e **vaqueiros** que aceitaram participar deste trabalho. Obrigada pela confiança depositada.

Agradeço aos amigos que fizeram parte dessa jornada: **Francisco Danilo, Francisco das Chagas Santos (Arroz), Francisco (Chiquim), Gregori, Railton, Ricardo Holanda e Weslley**. Meus queridos vocês foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo **George Miranda**, companheiro de trabalho, amigo para a vida!!!!

Aos membros da banca (Drª. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, Dra. Carla Cristina Guimarães de Moraes, Dra Tânia Vasconcelos Cavalcante, e Dr. Helder de Moraes

Pereira) por aceitaram participar da banca examinadora dessa tese e pelas contribuições sugeridas para melhorá-la.

A professora **Dra. Katiene Silva Régia (UFMA)** que realizou a análise estatística, moldando o trabalho e sendo sempre muito prestativa, sua ajuda e apoio foram imprescindíveis.

A professora **Dra. Ana Lyss B. B. Mineiro (UFPI),** por ter cedido o seu laboratório.

Aos pesquisadores do laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico de São Paulo: **Dra. Lilia Márcia Paulin** e **Dra. Vanessa Castro** pelo auxílio para a realização do diagnóstico da leptospirose.

Professora **Dra. Solange Maria Gennari**, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP / São Paulo, muito obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório nos oferecendo toda a infra-estrutura e auxílio para a realização do diagnóstico da neosporose.

Não poderia deixar de mencionar o nome de **Marcos Gomes Lopes**, amigo e ingressante do curso de graduação em Medicina Veterinária junto comigo e que mesmo muito tempo sem nos vermos não mediu esforços para me auxiliar na parte experimental deste trabalho.

Obrigada **Ana Beatriz Melles Cassinelli** por ter aceito participar deste trabalho e pelo valioso auxílio, dedicação e paciência conferido.

Aos amigos **Aloísio Ribeiro, Dayanne Anunciação, Fernanda Patrícia, Genilda Amaral, Jaquelynne Neiva, Karita Cibelle, Lauro César, Luanna Soares, Luciana Machado e Pollyana Oliviera**. Obrigada pelos conselhos, confiança, amizade e momentos de descontração.

Aos residentes da área da Universidade Federal do Piauí na área de reprodução, **Sabrina Lopes, Gustavo e Dayanne**. Muito obrigada pela ajuda e companheirismo no desenvolvimento deste estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, LBRA/UFPI, **Antônio de Sousa Junior, Deyse Naira, Dona Noêmia, Felipe Nunes e Barçante, Ícaro, Isolda Márcia, James, Jefferson, Leopoldina, Luiz Harliton, Marcos, Marlon de Araújo, Micherlene, Sávio, Vivviany e Yndyra Nayan.** Obrigada pelo apoio e amizade.

Enfim, a todos, que direta ou indiretamente, independente da função, grau de parentesco e/ ou instrução contribuíram neste percurso e que não foram supracitadas, terão sempre meu reconhecimento e estarão em meus pensamentos. O MEU MUITO OBRIGADA !!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **X**

LISTA DE TABELAS ..... **Xi**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **Xii**

RESUMO ..... **Xiii**

ABSTRACT ..... **Xiv**

1. INTRODUÇÃO GERAL **15**

2. REVISÃO DE LITERATURA **17**

2.1 Brucelose Bovina **17**

2.1.1 Características gerais do agente **17**

2.1.2 Fonte de infecção e vias de eliminação **19**

2.1.3 Patogenia **20**

2.1.4 Sinais Clínicos **21**

2.1.5 Epidemiologia **22**

2.1.6 Diagnóstico **23**

2.2 Leptospirose Bovina **26**

2.2.1 Características gerais do agente **26**

2.2.2 Fonte de infecção e vias de eliminação **27**

2.2.3 Patogenia **28**

2.2.4 Sinais Clínicos **28**

2.2.5 Epidemiologia **29**

2.2.6 Diagnóstico **30**

2.3 Neosporose Bovina **32**

2.3.1 Características gerais do agente **32**

2.3.2 Ciclo de vida e transmissão **33**

2.3.3 Patogenia e sinais clínicos **35**

2.3.4 Diagnóstico **37**

3 CAPÍTULO I **40**

4 CAPÍTULO II **55**

5 CAPÍTULO III **81**

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **91**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **92**

8 ANEXO **99**

Lista de Figuras

Capítulo I **Pág**

Figura 01. Mapa do Estado do Piauí destacando a microrregião de Floriano e seus municípios ---------- 51

Capítulo II

Figura 01. Mapa da microrregião de Floriano, estado do Piauí, Brasil.---------- 72

Lista de Tabelas

Capítulo I **Pág.**

Tabela 01. Variaveis qualitativas analisadas no estudo de fatores de risco para brucelose bovina entre os animais avaliados (414) e as propriedades na Microrregião de Floriano, estado do Piauí, Brasil, 2016. ---------- 52

Tabela 02. Frequência de bovinos reagentes para brucelose nos testes AAT e 2-ME, por município da Microrregião de Floriano, estado do Piauí, 2016. ---------- 54

Capítulo II

Tabela 01. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* e sorovares predominantes por município da microrregião de Floriano, Piauí, Brasil, 2016. ---------- 73

Tabela 02. Distribuição dos sorovares reagentes de *Leptospira interrogans* em amostras de sangue pelo método de soro aglutinação microscópica (SAM) em 414 bovinos da microrregião de Floriano, Piauí, Brasil, 2016. ---------- 74

Tabela 03. Análise univariada dos possíveis fatores de risco para leptospirose bovina em rebanhos com atividade resprodutiva na microrregião de Floriano, Piauí, Brasil, 2016. ---------- 75

Tabela 04. Modelo final da regressão logística dos fatores de risco (odds ratio) para leptospirose bovina em rebanhos da microrregião de Floriano, Piauí, Brasil, 2016. ---------- 80

Capítulo III

Tabela 01. Frequência de bovinos reagentes para *Neospora caninum* por município da Microrregião de Floriano, PI, 2016. ---------- 85

Tabela 02. Distribuição da frequência de anticorpos IgG anti - *Neospora caninum* (RIFI) em soros de bovinos por município da microrregião de Floriano, PI, 2016.---------- 85

Tabela 03. Modelo final da regressão logística de fatores de risco (odds ratio) para *Neospora caninum* em rebanhos bovinos da microrregião de Floriano, PI, 2016. ---------- 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
ADAPI	Agência de Defesa Agropecuária do Píauí
BA	Bahia
et al.	e colaboradores
IA	Inseminação Artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina tipo G
IgM	imunoglobulina tipo M
N	Número
OIE	Organização Mundial para Saúde Animal
OR	*Odds ratio*
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PI	Piauí
PNCEBT	Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAL	Soroaglutinação Lenta em Tubos
MAT	Teste de Aglutinação Microscópica
SC	Santa Catarina
SNC	Sistema Nervoso Central
spp.	Espécies
2-ME	2-mercaptoetanol
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USP	Universidade de São Paulo
X^2	Qui-quadrado
°C	Graus Celsius

RESUMO

As doenças infecciosas que afetam a reprodução são responsáveis por diminuição nos índices reprodutivos e produtivosdos rebanhos, por ocasionarem repetição do cio, redução das taxas de ovulação, fertilização, sobrevivência embrionária, sobrevivência fetal e sobrevivência perinatal. No Piauí são escassos ou inexistem pesquisas sobre a ocorrência e distribuição de enfermidades infecciosas de bovinos e em particular aquelas que interferem com a produtividade dos rebanhos e eficiência reprodutiva. Tendo em vista a importância da bovinocultura para a microrregião e as perdas econômicas geradas por estas doenças, o objetivo deste trabalho foi determinar a infecção de *Brucella* spp, *Leptospira* spp e *Neospora caninum* e possíveis fatores de risco associados à presença destes agentes em rebanhos bovinos da microrregião de Floriano, PI. Foram coletadas amostras de 414 soros de bovinos e 17 de soro de cães (*Neospora caninum*) oriundos de 22 propriedades distribuídos nos 12 municípios que compõe a área de estudo. Em cada propriedade foi aplicado um questionário, a fim de obter informações epidemiológicas e práticas de manejo empregadas. Para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina foi utilizado o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como prova de triagem e os soros que reagiram ao referido teste foram submetidos à prova confirmatória do 2-mercaptoetanol (2-ME). Já para a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp foi realizado Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), utilizando 23 sorovares. O teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum*, considerando ponte de corte de 1:100. Das 414 amostras examinadas, apenas 0,48% (2) apresentaram anticorpos anti-*B. abortus*, ao teste do AAT, porém, nenhuma reagiu ao teste confirmatório de 2-ME. A pesquisa de anticorpos Anti-*Leptospira* spp, revelou que 100% das propriedades possui pelo menos um animal sororeagente, com 143 positivos (SAM>1:100), resultando em uma prevalência de 34,54% (186) por animal sendo 95,1% fêmeas (136) e 4,9% machos (07) e apresentando 25,87% (37) de coaglutinações. Observou-se a presença de 19 sorovares dos 23 testados, destacando-se o Icteriohaemorragiae 42,48% (79) como o de maior prevalência, seguido pelo sorovar Hardjo 31,2% (58), Pomona 4,3% (8) e Castellonis 4,3% (8). Foram identificados como fatores de risco para a infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp. na análise de regressão logística multivariada quarentena (OR = 16,172; p = 0,024), ausência de vacinação contra de leptospirose (OR = 0,090; p = 0,037), e isolamento de animais doentes (OR = 0,006; p = 0,030). Constatou-se a presença de anticorpos anti-*N.caninum* em 35(8,45%) das 414 amostras de soro bovino, sendo 34 (97,14%) fêmeas e 01(2,86%) macho, com títulos variando de 100 a 6400. Não foram observados cães sororeagente para o agente. Das 22 propriedades investigadas, 18(81,81%) tiveram pelo menos um animal sororeagente, com a presença de anticorpos do parasita. Não foi identificada associação entre as variáveis avaliadas no questionário epidemiológico e a presença do protozoário em bovinos na microrregião (p > 0,05). Sob as condições em que este estudo foi realizado, conclui-se que a brucelose bovina apresenta baixo índice de prevalência na região, destacando-se como doenças infecciosas da reprodução amplamente difundidas na área de estudo a leptospirose e a neosporose.

Palavras-chave: bovino, leptospirose, brucelose, neosporose, Piauí.

ABSTRACT

Infectious diseases that affect reproduction are responsible for a decrease in the reproductive and productive rates of the herds, due to the repetition of estrus, reduction of ovulation rates, fertilization, embryonic survival, fetal survival and perinatal survival. To minimize the damage caused by microorganisms, it is necessary to know their distribution and behavior. In spite of the numerous studies already carried out in Brazil, in Piaui, there is little or no research on the occurrence and distribution of infectious diseases of cattle, particularly those that interfere with herd productivity and reproductive efficiency. The objective of this work was to determine the presence of *Brucella* spp, *Leptospira* spp and *Neospora caninum* and possible risk factors associated with the presence of these agents in bovine herds. micro-region of Floriano, Piaui state, Brazil. The work was carried out in twelve citys. 414 samples of bovine serum and 17 serum of dogs (*Neospora caninum*) were analyzed. In each property a questionnaire was applied in order to obtain epidemiological information and management practices employed. For the serological diagnosis of bovine brucellosis, the buffered Acidified Antigen Test (AAT) was used as the screening test and the sera that reacted to the test were submitted to the confirmatory test of 2-mercaptoethanol (2-ME). Already for the research of anti-*Leptospira* spp was performed Microscopic Agglutination Test (MAT), using 23 serovars. The Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) was used to investigate anti-*Neospora caninum* antibodies, considering a 1: 100 cutoff. Of the 414 samples examined, only 2/414 (0.48%) had anti-*Brucella abortus* antibodies to the AAT test, however, none reacted to the 2-ME confirmatory test. The anti-*Leptospira* spp antibodies revealed that 100% of the properties had at least one seroreagent animal, with 143 positive (SAM> 1: 100), resulting in a prevalence of 34.54% per animal and 95.1% females (136) and 4.9% male (07) and presenting 25.87% (37) of coagglutinations. The presence of 19 serovars from the 23 tested, with Icteriohaemorragiae (42.48%) being the most prevalent, followed by serovar Hardjo (31.2%), Pomona (4.3%) and Castellonis (4.3%). *Leptospira* spp. Were identified as risk factors for infection for any serovar. (OR = 16.172, p = 0.024), absence of vaccination against leptospirosis (OR = 0.090, p = 0.037), and isolation of diseased animals (OR = 0.006, p = 0.030). The presence of anti-*N.caninum* antibodies was found in 35 (8.45%) of the 414 bovine serum samples, being 34 (97.14%) females and 01 (2.86%) male, with titles ranging from 100 to 6400. No dogs were observed seroreagent for the agent. Of the 22 investigated properties, 18 (81.81%) had at least one seroreagent animal, with the presence of parasite antibodies. No association was identified between the variables evaluated in the epidemiological questionnaire and the presence of the protozoan in cattle in the micro-region (p> 0.05). Under the conditions in which this study was carried out, it was concluded that bovine brucellosis presents a low prevalence rate in the region, with leptospirosis and neosporosis being the most widely spread infectious diseases in the study area.

Keywords: Bovine, leptospirosis, brucellosis, neosporosis, Piaui.

1- INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país com grande vocação para pecuária, tendo atualmente no setor produtivo animal, grande importância econômico-social. É o segundo maior produtor de bovinos do mundo, com aproximadamente 210 milhões de cabeças no ano de 2015 (IBGE, 2016). O Piauí encontra-se em quinto lugar no Nordeste na produção de bovinos, com um rebanho efetivo de, aproximadamente, 1,9 milhões de cabeças (ADAPI, 2014).

A bovinocultura no estado constitui uma atividade tradicional da pecuária desde o processo de colonização do Brasil, em que utilizam a vegetação natural para a manutenção e sobrevivência dos ruminantes, além disso, representa uma importante alternativa de renda (carne e leite) para os produtores da região, contudo, a atividade ainda é caracterizada pelos baixos índices produtivos e reprodutivos dos rebanhos, em que inúmeros fatores podem estar afetando, como o inadequado manejo alimentar e sanitário dos rebanhos e a ocorrência de doenças infecciosas. Dentre as causas infecciosas podem ser citados os agentes virais, bacterianos e parasitários (Del Fava et al., 2007). Estes são responsáveis por ocasionarem: repetição do cio, redução das taxas de ovulação, fertilização, sobrevivência embrionária, sobrevivência fetal e sobrevivência perinatal (Nascimento; Santos, 2003).

O nascimento de bezerro debilitado ou com anomalias teratogênicas, fetos mumificados, infertilidade e retenção de placenta são outras formas comuns de manifestação clínica de distúrbios da reprodução constantemente relatados pelos produtores (Pellegrin et al., 1997). Como consequências podem ser observadas alterações significativas nos parâmetros da reprodução, tais como, o aumento do intervalo de partos, aumento do número de doses de sêmen ou de serviços por concepção e redução no número de animais nascidos e desmamados (Junqueira; Alfieri, 2006).

A Brucelose, Leptospirose, e Neosporose são exemplos de doenças que determinam perdas significativas. Inquéritos sorológicos realizados em todo o Brasil têm demonstrado diferentes percentuais de soropositividade para estas enfermidades (Silva et al., 2009, Mineiro et al., 2010; Bruhn et al., 2013).

Apesar dos inúmeros estudos já realizados no Brasil, no Piauí são escassos ou inexistem pesquisas sobre a ocorrência e distribuição de

enfermidades infecciosas de bovinos e em particular aquelas que interferem com a produtividade dos rebanhos e na eficiência reprodutiva. Tendo em vista a importância da bovinocultura para a microrregião e as perdas econômicas geradas por estas doenças, o objetivo deste trabalho, foi determinar a presença de anticorpos anti - *Brucella* spp*, Leptospira* spp*.* e *Neospora caninum*, assim como, verificar os fatores de risco associados às infecções em rebanhos bovinos da microrregião de Floriano do Estado do Piauí.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brucelose Bovina

2.1.1 Características gerais do agente

A brucelose é uma antropozoonose presente no mundo todo, particularmente importante em países em desenvolvimento (Neta et al., 2010) e endêmica em algumas regiões, como o Oriente Médio, Ásia, África, América do Sul (Corbel, 2006) e nos Estados Unidos, onde persistem focos da infecção em espécies selvagens sendo responsável por perdas econômicas relevantes em consequência de problemas de saúde pública e animal (Figueiredo et al., 2015). É uma enfermidade de evolução crônica e caráter granulomatoso difuso, que na maioria das vezes persiste por toda a vida do animal, caracterizada pela infecção de células do sistema mononuclear fagocitário e que acometem muitas espécies de mamíferos silvestres e domésticos inclusive o homem (Paulin; Ferreira Neto, 2003).

A brucelose é classificadas microbiologiacamente como cocobacilos gram negativos curtos e pleomórficos de 0,5 a 0,7 μm de diâmetro e de 0,6 a 1,5 μm de comprimento (Probert et al., 2004; Brasil, 2006), intracelular facultativo, imóveis, não capsulados e não esporulados pertencentes à família α2-Proteobacteriacea (Garrity, 2001) e integrante do gênero *Brucella* (Paulin; Ferreira Neto, 2003; Nielsen et al., 2004).

São considerados micro-organismos aeróbios ou microaeróbios, uma vez que em atmosfera com tensão de 5 a 10% de CO^2 favorecem o desenvolvimento de algumas cepas. Exibem uma temperatura de multiplicação em torno de 20 a 40 °C, com temperatura ideal de 37°C e com pH ótimo entre 6,6 a 7,4(Alton et al., 1988; OIE, 2009).

Após recentes descobertas de novas estirpes de *Brucella*, até o presente momento, são reconhecidas dez espécies do gênero apresentando sua nomenclatura baseada principalmente nos seus hospedeiros preferenciais (Godfroid et al., 2011; Bargen et al., 2012), o que atribui ao agente propriedades inerente a disseminação, permitindo a sobrevivência em diferentes ambiente, bem como possibilitando a adaptação a múltiplos

hospedeiros (Halling et al., 2005) . Um grupo composto por seis espécies clássicas, algumas das quais compreendem diferentes biovares: *B. melitensis* isoladas de caprinos e ovinos (biovares 1, 2, 3), *B. abortus* em bovinos e bubalinos (biovares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9), *B. suis* em suínos (biovares1, 2, 3, 4, 5), *B. neotomae* (roedores), *B. ovis* (ovelhas), *B. canis* (cães), *B. ceti* e *B. pinipedialis*, isoladas de mamíferos marinhos (focas, golfinhos, leões marinhos e baleias), *B. microti* (procedentes de ratazanas selvagens) (Scholz, et al 2008) e *B. inopinata*, isolada a partir de uma prótese mamária humana (Scholz, et al 2010; De Santis et al., 2013). A espécie considerada mais virulenta é a *B. melitensis* para humanos, todavia, no Brasil não há relatos de sua existência (Lilenbaum et al., 2007). O principal agente para os bovinos é a *B. abortus* biotipo 1, presente em todo o mundo (Paulin; Ferreira Neto, 2003)

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* possuem características morfológicas específicas associadas às características de multiplicação em meios de cultura no cultivo primário e na composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, o que confere a classificação do gênero em dois grupos: um de morfologia colonial lisa ou rugosa (rugosa estrita ou mucóide) (Cardoso et. al. 2006).

A morfologia colonial lisa possui uma porção tóxica lipídeo A, bem como uma molécula completa de LPS composto da porção antigênica cadeia O, que possui relação com a virulência de algumas espécies, já nas colônias rugosas a molécula é incompleta não apresentando o antígeno O (Smith; Ficht, 1990; Paulin; Ferreira Neto, 2003 Cardoso et al., 2006).

As espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae* geralmente possuem morfologia de colônia lisa e ao sofrerem mutações para formas rugosas ou mucóides, deixam de ser patogênicas. Estas espécies com exceção da *B. neotomae* são altamente patogênicas e responsáveis por doenças graves, principalmente em caprinos e ovinos, suínos e bovinos, respectivamente, assim como no homem. As espécies *B. canis* e *B. ovis* demonstram morfologia de colônias de lipopolissacarídeo rugoso (LPR) e antígenos proteicos, o que possibilita que a maior parte dos testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* lisa utilizem antígeno de *B. abortus*(OIE, 2009; Poester et al., 2010).

A composição da parede celular das brucelas confere a elas resistência ao meio ambiente podendo sobreviver por longos períodos, todavia, não conseguem se multiplicar nele, para isso precisam de condições de umidade, sombreamento, pH neutro, baixas temperaturas e matéria orgânica, podendo resistir em pastagens, fetos abortados, anexos fetais e fezes úmidas (Paulin; Ferreira Neto, 2003; Brasil, 2006; OIE, 2009).

A resistência da bactéria no leite e produtos lácteos depende da temperatura, pH e da presença de outros microrganismos que possam dificultar a multiplicação, podendo sobreviver no alimento de 15 a 90 dias (Paulin; Ferreira Neto, 2003; Brasil, 2006). A *Brucella* sobrevive a refrigeração do leite, contudo os processos de pasteurização, fervura e esterilização são capazes de inativar a bactéria (Lage et al., 2008).

Na carne vivem pouco tempo dependendo da quantidade de bactérias presentes e do tipo de tratamento sofrido pela carne (Riet-Correa, 2006).

São sensíveis ao calor e à acidez, e quando submetidas à ação de desinfetantes comuns, como soluções de formaldeídos a 2%, compostos fenólicos a 2,5%, produtos clorados (2,5% de cloro ativo) e permanganato de potássio (1:5000) eliminam a *Brucella spp* em até quinze minutos. A utilização de álcool a 70% destrói imediatamente as bactérias e o carbonato de cálcio (1:10) em trinta minutos (Paulin; Ferreira Neto, 2003; OIE, 2009).

2.1.2- Fonte de infecção e vias de eliminação

A principal fonte de infecção é representada pelo animal portador, que elimina uma grande quantidade do agente durante o abortamento e parto dos animais infectados (Xavier et al., 2009). Uma elevada carga de *Brucella* é eliminada podendo persistir por até 30 dias (Crawford et al., 1990). Os bovinos ao lamber e cheirar recém-nascidos ou também fetos abortados, especialmente por outras vacas facilitam a transmissão da *Brucella* (Crawford et al., 1990).

A disseminação das bactérias pode ocorrer por descargas uterinas (produtos do abortamento e lóquios placentários), leite, urina e fezes, contaminando pastagens, alimentos e água (Acha; Szyfres, 2003; Lilenbaun et al. 2007; Paula et al., 2015).

A transmissão pelo sêmen assume papel importante durante a inseminação artificial, momento em que o sêmen é depositado diretamente no

útero, eliminando as barreiras naturais facilitando a transmissão (Paulin; Ferreira Neto, 2003).

2.1.3- Patogenia

A patogenicidade da bactéria está fortemente relacionada aos mecanismos que permitem sua invasão, sobrevivência, replicação intracelular nas células fagocíticas, modulação da resposta imune do hospedeiro e disseminação para tecidos preferenciais por meio de tropismo celular (Nielsen et al., 2004; Figueiredo et al., 2015).

As Brucellas invadem o organismo através da mucosa nasofaríngea (inalação), conjuntival, através da pele (soluções de continuidade), todavia, a via mais comum de infecção para bovinos é o trato gastrointestinal (Crawford et al., 1990; Paulin; Ferreira Neto, 2008).

Posteriormente à penetração no organismo do hospedeiro, as brucellas são fagocitadas por células de defesa, sobretudo por macrófagos e outras células fagocitárias, onde sobrevivem e multiplicam-se. Inicialmente se alojam nos linfonodos regionais, podendo permanecer de semanas a meses, acarretando bacteremia, aumento do volume (hiperplasia) e linfadenopatia periférica (Bishop et al., 1994; Neta et al., 2010).

A invasão dos vasos linfáticos e a bacteremia subsequentes possibilita disseminação da infecção por todo o organismo e, consequentemente, a colonização de vários tecidos, especialmente, o útero gravídico, glândula mamária, linfonodos relacionados (ilíacos, mesentéricos e supramamários), órgãos genitais dos machos, podendo ainda acometer baço, fígado, ossos, articulações (Kennedy; Miller, 1993) e medula óssea (Nielsen; Duncan, 1990).

A *B. abortus* exibe um forte tropismo por órgãos que dispõe de elementos necessários para seu metabolismo, destacando-se, o eritritol (álcool polihídrico de quatro carbonos). Este composto possibilita a sobrevivência do agente uma vez que ele é capaz de metabolizá-la como fonte de carbono e energia estimulando o crescimento bacteriano (Samartino; Enright, 1996). O eritritol está presente no útero gravídico, tecidos mamários, ósteo-articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (Carter, 1991; Xavier et al., 2009)

A partir do quinto mês de prenhez (terço final) é possível detectar a presença de *B. abortus* nos cotilédones e nos tecidos fetais, como coração, baço, pulmão, rim e fígado (Sousa et al., 2015). O principal sítio de colonização dos tecidos placentários fetais são as células trofoblásticas eritrofagocítica (Santos et al., 1996) localizados na base das vilosidades coriónicas de ruminantes, local onde *B. abortus* provoca lesões nas junções intercotiledonárias. A multiplicação bacteriana intensa e as endotoxinas liberadas induzem a infiltração de células inflamatórias, necrose trofoblástico, vasculite e ulceração do corioalantóide. O abortamento acontece devido à gravidade e distribuição de lesões carunculares, que afetam as trocas metabólicas materno-fetal, através da redução de oxigênio fetal e deficiência de nutrientes (Paulin; Ferreira Neto, 2008; Xavier et al., 2009). O excesso de deposição de fibrina pode leva à retenção de placenta (Paulin; Ferreira Neto, 2008).

Os fetos abortados apresentam graus variáveis de autólise e podem ser edematoso com presença de órgãos abdominais cobertos com fibrina. Destaca-se a pneumonia como a lesão comumente descrita em fetos abortados em virtude da infecção por *B. abortus* (Xavier et al., 2009).

2.1.4- Sinais Clínicos

As manifestações clínicas das bactérias do gênero *Brucella* dependem da idade, *status* reprodutivo e imunológico, via de infecção e a carga infectante (natural ou experimental), assim como a estirpe (Adams, 2002; Xavier et al., 2009).

O principal sinal clínico da brucelose nos bovinos é o abortamento na primeira gestação após a infecção (Godfroid; Nielsen; Saegerman, 2010), geralmente no terço final da gestação (Caitano et al., 2014). Os animais infectados permanecem portadores por toda a vida. Nessa fase, os animais na maioria das vezes são assintomáticos ou apresentam poucos sinais e a bactéria persiste em linfonodos e glândulas mamárias (Paula et al., 2015). A infecção por *B. abortus* leva ainda à ocorrência de endometrites, retenção placentária, aumento do intervalo entre partos para até 20 meses resultando em queda da eficiência reprodutiva, além disso, destaca-se a redução na

vitalidade dos bezerros por morte precoce ou subdesenvolvimento (30%), queda no peso dos animais em torno de 15% e mastite intersticial multifocal com elevação do número de células somáticas do leite e redução da produção (Carvalho Neta et al., 2010; Paula et al., 2015).

2.1.5- Epidemiologia

A brucelose encontra-se mundialmente distribuída, sendo considerada uma das principais zoonoses. Embora tenha sido erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Austrália, Japão e Nova Zelândia, continua reemergente e se apresentando como um grave problema sanitário e econômico, principalmente em países da América do Sul, África, Oriente Médio e Ásia (Corbel, 1997; Paulin; Ferreira Neto, 2003; OIE, 2009).

No Brasil, a brucelose é endêmica, porém apresenta dados bastante diferenciados face à dimensão territorial e às características próprias de cada região (Poester et al., 2002; Ribeiro et al., 2008; Lage et al., 2008).

De acordo com o estudo epidemiológico nacional realizado em 1975, a brucelose bovina encontrava-se disseminada por todo o território brasileiro. As prevalências estimadas por regiões foram: Norte, 4,1%; Nordeste, 2,5%; Centro- Oeste, 6,8%; Sudeste, 7,5% e Sul, 4%. Posteriormente, outros inquéritos sorológicos, por amostragem, foram realizados por alguns estados, porém não foram evidenciadas grandes alterações em relação aos índices verificados em 1975. Os dados de notificações oficiais no período de 1988 a 1998 indicaram que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% (Poester et al., 2002; Brasil, 2006).

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), que consiste em um conjunto de medidas sanitárias estratégicas em busca da redução da prevalência e incidência da brucelose, implementando a vacinação compulsória de bezerras com idade entre três e oito meses, em todo o país. Dentre outras atividades previstas no programa destacam-se a adesão voluntária dos criadores na busca de rebanhos livres e monitorados, a prática de testes sorológicos

regulares em rebanhos de elite para a participação em feiras e exposições e o sacrifício dos animais positivos para brucelose (Brasil, 2006).

Após a implementação do PNCEBT, foram realizados inquéritos soroepidemiológicos em 18 unidades federativas (BA, DF, ES, GO, MG, MS, MT, PR, RJ, RS, RO, SC, SE, SP, TO, MA, PE e PB) a fim de conhecer a situação epidemiológica da doença no início do programa de controle, baseando-se na frequência e distribuição da enfermidade na população (Clementino et al., 2014).

Os resultados revelaram que a brucelose encontra-se disseminada nas diversas áreas estudadas e a situação encontra-se heterogênea entre os diversos estados brasileiros e, até mesmo, entre regiões de um mesmo estado. Evidenciou-se também uma tendência de aumento da prevalência da brucelose no sentido Centro-Oeste/Norte do país, principalmente nos estados tradicionais produtores de carne (Poester et al., 2009).

2.1.6- Diagnóstico

A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos ou pela combinação deles: o clínico (baseado nos sinais clínicos de abortamento, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de fêmeas e machos); o epidemiológico (fundamentados na história dos rebanhos); o laboratorial pode ser feito pela identificação do agente por métodos diretos (através do isolamento e identificação do agente etiológico, da reação em cadeia da polimerase – PCR, e as técnicas de imunohistoquímica) e/ou por métodos indiretos baseado na sorologia com as diferentes técnicas pela demonstração de anticorpos específicos nos fluídos orgânicos (Poester et al. 2005; Monteiro et al., 2006; Minharro, 2009).

O sorodiagnóstico é a principal ferramenta para o controle da brucelose em rebanhos, por permitir o monitoramento tanto da propriedade quanto de regiões. Todos os testes devem ser utilizados respeitando-se as normas técnicas estabelecidas pelos organismos internacionais, com antígenos padronizados e específicos para cada prova (Ruibal, 2009).

No Brasil, os testes sorológicos oficiais preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT

são: o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite, 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento. Os dois primeiros como teste de triagem de rebanhos e os dois últimos como confirmatório (BRASIL, 2006).

O teste de soroaglutinação com o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) é um método indireto e baseia-se na detecção da IgG1. É preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com rosa de bengala (Brasil, 2006). Esta acidificação do antígeno reduz a ação da IgM, tornando a prova seletiva para a identificação da IgG1. Este teste possui alta sensibilidade, é prático e de baixo custo, e ainda é realizado em um menor espaço de tempo (Megid et al,. 2000). Além disso, detecta com maior precocidade as infecções recentes (Brasil, 2006).

O teste do anel em leite é um método eficaz e barato para a vigilância de brucelose em bovinos de leite (Blood et al., 1991). Revela imunoglobulinas da classe A (IgA), presentes no leite e aderidos às moléculas de gordura. São utilizados antígenos corados com hematoxilina que ao se testar o leite dos bovinos, se houver presença de anticorpos os mesmos reagirão com o antígeno, formando uma coloração azulada característica da reação positiva, ocorrendo pela interação antígeno-anticorpo que arrastada pelos glóbulos de gordura, gera a ocorrência de um anel azulado na camada de creme do leite (Paulin; Ferreira Neto, 2003). Tal prova possui restrições, pois pode apresentar resultados falsos positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de animais portadores de mamites ou, ainda, de animais em início de lactação (colostro) (BRASIL, 2006).

O teste do 2 - Mercaptoetanol (2-ME) é um teste confirmatório, preconizado pelo PNCEBT e indicado quando se deseja confirmar o resultado de teste de triagem. É uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença da IgG, no soro, indicando a infecção crônica. Deve ser sempre utilizada em paralelo com a prova lenta em tubos. Esta prova está fundamentada no fato de anticorpos da classe IgM, com configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol, fazendo com que estas subunidades percam seu poder aglutinante. Com isso, soros com predomínios de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta.

A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME (Brasil, 2006).

A Reação de Fixação de Complemento (FC) baseia-se na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento e com isso detectar precocemente IgG1 no soro sanguíneo em torno do 14º dia, sendo que as provas de aglutinação o fazem ao redor do 30º dia. A variação da técnica a quente é mais prática, pois diminui as reações anticomplementares e elimina a IgM, aumentando a especificidade do teste (Paulin; Ferreira Neto, 2003). Porém a FC é uma prova mais trabalhosa e mais cara que as de aglutinação exigindo pessoal treinado e laboratório bem equipado (Brasil, 2006). É considerado o teste de referência recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal para o trânsito internacional de animais (OIE, 2009).

O isolamento e identificação é o método de referência de diagnóstico da brucelose, porém a identificação da *B. abortus* é um processo lento, caro e de alto risco para o laboratorista, pois envolve a manipulação de placentas contaminadas, exsudatos vaginais, sêmen, tecidos de fetos abortados ou leite contaminado, que exige a observação de normas estritas de biossegurança (Poester et al, 2005; Brasil, 2006; Minharro, 2009).

Uma alternativa ao isolamento e identificação da bactéria é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) que é um método de identificação direto, rápido, altamente sensível e muito específico e que se mostra útil como uma ferramenta epidemiológica e para os programas de erradicação espécie-específicos (Bricker, 2002). A sensibilidade da PCR depende da quantidade de DNA presente na amostra e a pureza do DNA; e a especificidade depende do gene e sequência dos *primers* escolhidos (Fekete et al., 1990).

Nos últimos anos, diversos ensaios baseados na técnica da PCR foram descritos para a identificação da B*rucella* sp. Alguns utilizam como alvo, sequências conservadas do gênero *Brucella*, como o gene do RNA ribossômico 16S ou gene que codifica a proteína bspc31, possibilitando a identificação genérica dos isolados. Estes ensaios revelaram uma alta especificidade por ser possível detectar um número bastante reduzido de bactérias na amostra, porém podem apresentar resultados falso – positivos apenas com o

Ochrobactrum anthropi, micro-organismo do gênero mais relacionado com *Brucella* spp. (Poester et al, 2005).

A PCR já foi empregada com sucesso tanto para culturas puras como para a detecção da *Brucella* spp em várias amostras biológicas, como cotilédones, linfonodos supra-mamários e pré-escapulares, úbere e fígado (Ruibal, 2009); sangue (Vieira, 2004); leite (Romero; Lopez-Goñi, 1999); sêmen e urina (Nozaki, 2008). A análise direta das amostras clínicas possui a vantagem do resultado ser imediato, porém requer um maior cuidado no preparo da amostra, para remover componentes inibidores da PCR.

2.2 Leptospirose Bovina

2.2.1- Características gerais do agente

A leptospirose é incontestavelmente a zoonose bacteriana mais difundida no mundo, presente em todos os continentes, ocorrendo em ambas as áreas urbanas e rurais de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Evangelista et al., 2015) com exceção da Antártica (Adler; Moctezuma, 2010). Além disso, é considerada uma doença emergente, endêmica em países tropicais como o Brasil (Ullmann et al., 2012).

A leptospirose é causada por espiroquetas, pertencentes a ordem Spirochetales, família *Leptospira*ceae e do gênero *Leptospira* , que acomete animais domésticos, silvestres e o homem, representando, consequentemente, um importante problema de saúde pública (Faine, 1999; Levett, 2001).

Anteriormente, o gênero *Leptospira* estava dividido em duas espécies, de acordo com critérios antigênicos: *Leptospira interrogans*, da qual faziam parte todas as cepas patogênicas, e *L. biflexa*, contendo cepas saprófitas isoladas do ambiente. Estudos taxonômicos recentes, baseados na homologia do DNA, permitiram a reclassificação do agente em pelo menos 19 espécies, sendo seis espécies saprófitas e treze patogênicas.

As espécies patogénicas, que podem infectar o homem e os animais, inclue: *L. alexanderi, L. alstonii, L. borgpetersenii, L. inadae, L. interrogans, L. fainei, L. kirschneri, L. licerasiae, L. noguchii, L. santarosai, L. terpstrae, L. weilii e L. wolffii,* com mais de 260 sorovares; e as genomoespécies saprófitas de

vida livre que se encontram principalmente em água doce e muito raramente infectam o homem e outros animais, *incluem: L. biflexa L. meyeri, L. yanagawae, L. kmetyi, L. vanthielii e L. wolbachi*, que compreendem mais de 60 sorovares (Adler; Moctezuma, 2010).

As *Leptospira*s são micro-organismos helicoidais, muito finos (0,1µm de diâmetro) com comprimento de 6 a 20 µm, enroladas, móveis, aeróbios estritos, que apresentam uma ou ambas as extremidades encurvadas ou em forma de gancho, dotados de grande motilidade, é uma função dos dois flagelos periplasmáticos, (fibrila axial e endoflagelo) que ocorrem em cada célula onde está inserido em cada extremidade e raramente se sobrepõe na região central (Machry et al., 2010). Crescem muito bem em temperaturas de 28 a 30°C, possuem multiplicação e crescimento lentos e são exigentes no que se refere a meios nutritivos (Hanson, 1982; Adler; Moctezuma, 2010).

A dupla membrana e a presença de LPS são características de bactérias Gram-negativas, enquanto que a estreita associação da membrana citoplasmática com parede celular mureína é uma reminiscência da arquitetura envelope de Gram-positivas (Haake, 2000; Levett, 2001).

São micro-organismos muito sensíveis à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos. O período de sobrevida das *Leptospira*s patogênicas na água varia conforme a temperatura, o pH, a salinidade e o grau de poluição. Possui multiplicação ideal em pH compreendido entre 7,2 e 7,4, podendo permanecer vivas por até 180 dias na água (Langoni, 1999). No meio ambiente, sobrevivem bem em terrenos úmidos, pântanos, córregos, lagos e estábulos que possuam excesso de umidade. São muito sensíveis ao pH ácido e à dessecação (Faine et al., 1999).

2.2.2- Fonte de infecção e vias de eliminação

A leptospirose pode ser transmitida diretamente através do contato com secreções, sangue ou urina de animais infectados ou indiretamente através do contato com a água contaminada, principalmente com a urina de portadores (Bharti, et al., 2003; Adler; Monteczuma, 2010; Langoni et al., 2016). Quase todos os mamíferos aquáticos e terrestres (principalmente cães, bovinos e suínos) em todo o mundo podem desempenhar o papel de portadores

potenciais de *Leptospira* . Destaca-se o papel dos camundongos (*Mus musculus*), (sorotipo: *Ballum* e *Icterohaemorrhagiae*) e ratos (principalmente *Rattus norvegicus* e *R. rattus* sorotipo *Copenhageni*) (Bharti et al., 2003) são considerados os principais reservatórios do patógeno, porque eles abrigam *Leptospira* em seus rins e eliminá-los ativamente na sua urina para o meio ambiente, contaminando água, solo e alimentos (Langoni et al., 2016).

Uma vez infectados, os bovinos eliminam o agente na urina por um período de tempo variável, que pode chegar a mais de um ano, tendo caráter intermitente (Rebhun, 1995). A infecção pode ocorrer por meio do contato com pasto, água e alimentos contaminados com urina infectada, fetos abortados e secreções uterinas de animais portadores e mais raramente a transmissão pode acontecer através das vias transplacentária e mamária (Corrêa; Corrêa, 1992).

2.2.3 Patogenia

A patogenia da leptospirose ocorre a partir da penetração ativa da bactéria nas mucosas, pele lesada ou até mesmo através da pele íntegra. Neste último caso a penetração pode ocorrer em condições que favoreçam a dilatação dos poros, ou seja, quando há uma permanência em tempo prolongado em coleções de águas contaminadas pela bactéria. A infecção pode ocorrer ainda, por meio do contato com pasto, água e alimentos contaminados com urina infectada, fetos abortados e secreções uterinas de animais portadores e mais raramente a transmissão pode acontecer através das vias transplacentária e mamária (Corrêa; Corrêa, 1992;).

Após a invasão, as *Leptospira* se multiplicam no interstício e nos humores orgânicos, caracterizando um quadro agudo septicemico, marcado pela leptospiremia. Os micro-organismos causam lesões nas células endoteliais de revestimento celular devido sua ação mecânica neste tecido, lesando os pequenos vasos, levando a hemorragias, seguidas da formação de trombos e do bloqueio do aporte sanguíneo nas áreas atingidas (Adler; Moctezuma, 2010).

2.2.4- Sinais Clínicos

A leptospirose é uma doença sistêmica caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e insuficiência reprodutiva. Os sinais clínicos são muito variáveis, na maioria dos casos são provavelmente inaparente e associado com sorovares adaptado ao hospedeiro, como *Canicola* em cães, *Bratislava* em cavalos e porcos, *Hardjo* em bovinos e *Australis* e *Pomona* em suínos (Adler; Monteczuma, 2010). Em casos graves, outros sorovares podem estar envolvidos.

A Leptospirose em bovinos é caracterizada principalmente por problemas reprodutivos com perdas econômicas não quantificadas, caracterizados por: infertilidade, o aumento no número de serviços por concepção, aumento do intervalo entre partos, abortamento (geralmente no terço final da gestação), ocorrência de natimortos, mumificação fetal e nascimento de bezerros fracos (Lilenbaum; Martins, 2014), bem como à queda da produção de carne e leite, além de custos com despesas de assistência veterinária, vacinas e testes laboratoriais (Faine et al. 1999).

2.2.5- Epidemiologia

Os sorovares de *Leptospira* mais frequentemente encontrados infectando bovinos no Brasil são: o sorovar Pomona, Icterohaemorragiae, Grippothyphosa, Bratislava, Canicola*,* Ballum, Szwajisak e Hardjo (Vasconcelos et al., 1997). O sorovar Hardjo tem sido apontado como causador de abortamento e infertilidade em rebanhos bovinos de leite (Dhaliwal et al., 1996). Frequentemente os animais de produção são considerados hospedeiros de manutenção da sorovariedade Hardjo, pois possuem elevada suscetibilidade à infecção, apresentando a doença na forma crônica, caracterizada por problemas reprodutivos (Chiareli et al. 2012).

Com vasta distribuição geográfica, é evidenciada em todo o mundo e particularmente prevalente em países de clima tropical e subtropical, principalmente nos períodos de altos índices pluviométricos devido à elevada sobrevivência da bactéria em ambientes úmidos, o que aumenta o risco de exposição e contaminação de animais suscetíveis e seres humanos (Acha;

Szyfres, 2003). No Brasil, a leptospirose é endêmica e está presente no rebanho bovino em quase todos os estados da federação (Mineiro et al., 2007).

Levantamentos sorológicos recentes realizados no Brasil evidenciaram elevadas prevalências para *Leptospira* spp. como os de Mineiro et al. (2007), no Piauí (52,9%), Castro et al. (2008), em São Paulo (71,3%), Oliveira et al. (2010), na Bahia (77,9%), Silva et al. (2012), no Maranhão (64,81%) e Pimenta et al. (2014), na Paraíba (89,7%).

Os inquéritos sorológicos com determinação dos fatores de risco exercem um papel de relevância indiscutível no controle da leptospirose, pois permitem o conhecimento dos diferentes sorovares existentes em determinada região (Faine et al. 1999), bem como as condições associadas à maior ocorrência da infecção, o que possibilita a elaboração de medidas de prevenção e controle e a aplicação das mesmas de maneira correta e eficaz (Pimenta et al., 2014).

2.2.6- Diagnóstico

Devido à grande diversidade de sinais clínicos, o diagnóstico da leptospirose pode ser confirmado por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção de anticorpos, na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético da bactéria na urina, fluidos corporais e nos tecidos (Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003).

O exame direto em microscopia de campo escuro pode ser utilizado no diagnóstico. Neste, as *Leptospira*s podem ser demonstradas no sangue na fase aguda da doença, entretanto, um resultado negativo não significa a ausência da enfermidade. O sangue deve ser colhido desfibrinado e imediatamente examinado ao microscópio de campo escuro entre lâmina e lamínula. Pode-se utilizar também o líquor e mais comumente a urina, só que nesta as *Leptospira* s estarão presentes mais tardiamente, a partir do 15º dia da doença. No entanto, esta prática requer técnicos capacitados, pois outros micro-organismos podem ser confundidos com as *Leptospira*s (Langoni, 1996).

A cultura para isolamento do agente e a inoculação em hamsters (*Mesocricetus auratus*) são técnicas mais eficientes e seguras de diagnóstico. Os meios mais utilizados para isolamento das *Leptospira*s são os de Fletcher (enriquecido com soro de coelho a 10%) e o EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris) com albumina e Tween 80. Pode-se cultivar sangue, líquor

ou urina, conteúdo estomacal de fetos abortados, conteúdo de rins, fígado e baço. As culturas devem ser realizadas imediatamente após o recebimento da amostra (Lilenbaum, 1996).

O isolamento das bactérias tem grande importância nos estudos de investigação epidemiológicas, sendo essencial para a identificação da cepa envolvida em surtos ou epidemias, ou mesmo circulante em determinada área geográfica (World Health Organization, 2003).

Deve-se ressaltar ainda que o isolamento de *Leptospira*s é extremamente difícil, e na maioria das vezes infrutífero. A partir do leite a dificuldade ainda é maior pela presença substâncias leptospiricidas, como ácidos graxos insaturados, e o rápido surgimento de anticorpos no soro do leite, sendo necessário o seu cultivo imediato após a coleta (Thiermann, 1982).

No diagnóstico sorológico, os testes de macroaglutinação e microaglutinação, são comumente utilizados, devendo-se avaliar amostras de pelo menos 10% do rebanho (Bolin; Alt, 1999). A reação de macroaglutinação é considerada gênero específico, e deve ser utilizada como prova de triagem. Os antígenos empregados constam de suspensão concentrada de *Leptospira*s inativadas pelo formol e podem ser adquiridos em *kits* comerciais. No entanto, esta prova apresenta algumas desvantagens, como o aparecimento frequente de resultados falso negativos e com menor frequência de falso positivos. Segundo o fabricante o teste reage melhor contra soros colhidos na fase aguda da doença (Langoni, 1996).

Dentre as formas indiretas a detecção de anticorpos séricos pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), com antígenos vivos, é considerada a prova de referência, considerada “padrão ouro” conforme preconiza a Organização Mundial da Saúde. Apesar de ser uma prova sorológica que permite a determinação do sorovar envolvido, esta reação não possibilita o reconhecimento da presença das *Leptospira* s, mas sim a resposta imunológica do hospedeiro infectado por se tratar de um modo indireto, portanto não indica se a infecção é ativa (Brandão et al., 1998). Os antígenos utilizados são culturas de cepas-padrão de *Leptospira* s, mantidas por repiques semanais em meio de EMJH. Quaisquer outras cepas poderão ser incluídas na bateria de antígenos, desde que representem situação epidemiológica local (Faine et al., 1999).

O teste de SAM detecta anticorpos das classes IgG e IgM com uma sensibilidade de 30% na fase aguda da doença, onde os títulos para as duas classes de Ig aumentam para 63% na segunda fase da doença e chega a 76% na fase convalescente, a especificidade do teste atinge 97% em todas as fases da infecção (Cumberland et al., 1999).

A interpretação dos resultados sorológicos é complexa por vários fatores: reação cruzada de anticorpos, títulos de anticorpos induzidos por vacinação e a falta de consenso sobre que títulos de anticorpos são indicativos de infecção ativa. Normalmente títulos de anticorpos > 100 são indicativos de infecção. Em resposta à vacinação, no geral o rebanho desenvolve baixos títulos de anticorpos aglutinantes (100 a 400) e estes persistem por um a seis meses (Nardi Júnior, 2007).

Nos últimos anos as técnicas moleculares, baseadas na detecção do DNA, como a PCR vêm sendo bastante utilizada para diagnóstico em fluidos e órgãos de várias espécies animais. Mostrando ser um método, rápido, prático e seguro no diagnóstico efetivo para a confirmação da infecção em bovinos (Mineiro et al., 2011).

2.3 Neosporose Bovina

2.3.1 Características gerais do agente

A Neosporose bovina é uma doença amplamente distribuída no mundo, que representa grande impacto econômico, sendo considerada uma das principais causas de perdas reprodutivas, relacionadas a eventos que sucedem a infecção, especialmente os casos de abortamento, retenção de placenta, retorno ao cio e aumento do intervalo de partos (Bandini et al., 2011; Alméria; López-Gatius, 2013; Wilson et al., 2016).

A enfermidade tem como agente o *Neospora caninum* (Dubey et al., 1988), que é um protozoário intracelular obrigatório, formador de cistos, do filo Apicomplexa, família Sarcocistidae, caracterizado por compartilhar diversas características morfológicas e biológicas com o protozoário *Toxoplasma gondii* (Dubey; Schares de 2011; Donahoed, 2015).

2.3.2 Ciclo de vida e transmissão

O *N.caninum* possui um ciclo de vida heteroxeno facultativo (capacidade de desenvolver-se em mais de um hospedeiro), que abrange um hospedeiro definitivo (cães, coiotes e lobos e uma série de outros hospedeiros intermediários, como ruminantes (bovinos, búfalos de água, caprinos e ovinos), aves e equinos (Williams et al., 2009; Dubey; Schares, 2011).

O ciclo de vida se caracteriza por três fases morfológicas distintas: taquizoítos (presentes nas células), bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (contidos nos oocistos esporulados) (Eiras et al., 2011).

Os taquizoítos são organismos proliferativos, redondos, globular, 16 ovóides ou em forma de “meia lua”, medem 3-7 x 1-5 µm, dependendo do estágio de crescimento, de divisão e do plano de corte dos tecidos (Monteiro, 2010). Possuem uma membrana plasmática de três camadas, além de três organelas secretoras distintas, que participam da invasão, formação e manutenção de um vacúolo parasitóforo presente no citoplasma das células hospedeiras possibilitando dessa forma a sobrevivência e a replicação rápida do parasito por endodiogenia podendo ocasionar lesões severas e rompimento de células (Hemphill et al., 1998; Dubey; Buxton; Wouda, 2006).

Nos animais infectados, a presença de taquizoítos indica a fase aguda da doença, em que é possível evidenciá-los em várias células como hepatócitos, células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos e células epiteliais dos túbulos renais (Dubey et al., 1999). Estes são capazes de atravessar a barreira placentária, podendo ser transmitidos verticalmente para suas crias (Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007).

Após o surgimento da resposta imune do hospedeiro com controle da infecção somado a outros fatores fisiológicos do hospedeiro desencadeia a entrada dos taquizóitos dentro das células transformando-os em bradizoítos, estabelecendo a formação do cisto. Os bradizoítos apresentam multiplicação lenta (do grego bradys = lento), forma alongada de cerca de 7 - 8µm por 2µm, possuem as mesmas organelas encontradas nos taquizoítos, todavia, com segmentos membranosos planos e vesículas menores (Dubey; Barr; Barta, 2002).

Os cistos são encontrados na fase crônica da infecção e têm predileção principalmente pelo tecido nervoso (cérebro, medula espinhal, cerebelo, nervos), na retina e no músculo esquelético. Os carnívoros (hospedeiros definitivos) se infectam ao ingerirem tecidos, tais como, fetos abortados, bezerros natimortos, placentas e membranas fetais (Reiterova et al., 2009) contendo em seu interior oocistos com bradizoítos. No intestino delgado ocorre a fase sexuada (entero-epitelial) e após cinco ou mais dias após a ingestão passam a excretar oocistos nas fezes (McAllister et al., 1998; Dubey; Barr; Barta, 2002; Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007).

Os oocistos medem cerca de 12 x 10 µm, possuem membrana transparente com 0,6-0,8 µm de espessura e englobam dois esporocistos, cada um medindo aproximadamente 8,4-6,1 µm. No interior de cada esporocisto existem quatro esporozoítos que são alongados e cada um mede cerca de 6.5 x 2.0 µm (Dubey; Barr; Barta, 2002).

A esporulação dos oocistos ocorre dentro de 24 horas após a excreção e varia de acordo com as condições de umidade, temperatura e oxigenação do ambiente. A quantidade de oocistos excretados e o período de excreção dos oocistos bem como o período pré-patente variam, e encontram-se entre 5 e 30 dias (Dubey, Schares; Ortega-Mora, 2007)

O protozoário *Neospora caninum* é transmitido de forma horizontal (principalmente cães, mas pode ocorrer em vacas também) e vertical (cães e bovinos).

Na transmissão horizontal, os hospedeiros definitivos (canídeos) alimentados com placentas provenientes de vacas soropositivas para *N.caninum* podem eliminar oocistos do parasito contendo esporozoítos pelas fezes contaminando água, alimentos e pastagens (Dijkstra et al. 2002; Lyon, 2010), e estes, quando esporulados e ingeridos pelos hospedeiros intermediários representam fontes de contaminação (Basso et al., 2010).

A transmissão venérea é possível, todavia, pouco provável uma vez que, sob condições experimentais, seria necessário uma elevada quantidade de taquizoítos para iniciar uma infecção (Ferre et al., 2008).

Outra forma de transmissão sugerida é através do leite demonstrada experimentalmente, entretanto, não existe um estudo conclusivo que

demonstre a transmissão lactogênica de *N.caninum* em infecções naturais em bovinos (Macedo et al., 2013)

A transmissão vertical assume importante papel como o principal modo de infecção em bovinos (Trees; Willians, 2005; Klauck et al., 2016), além disso, é responsável pela manutenção do agente, ocasionando na maioria das infecções congênitas no nascimento de animais clinicamente normais, mas persistentemente infectados(Yildz et al., 2009), em que aproximadamente 95% dos bezerros nascidos podem ser soropositivos (Dubey, Schares, 2011).

A transmissão vertical (transplacentária ou congênita) foi classificada em dois termos com objetivo de descrever mais precisamente a origem e rota da infecção dos fetos: transplacentária exógena e endógena (Trees; Willians, 2005; Williams et al., 2009).

A transplacentária exógena a infecção fetal ocorre como resultado da infecção primária, pela ingestão de oocistos, da vaca durante a gestação (Trees; Williams, 2005). Já a transplacentária endógena ocorre em fêmeas gestantes persistentemente infectadas, que sofrem modificações das respostas imunes (imunomodulação ou imunossupressão) estimulando reativação da infecção durante a gestação, com reconversão de bradizoítas em taquizoítos, que então possam infectar e atravessam a placenta, resultando em infecção fetal. A recrudescência ou reativação da infecção pode ocorrer ao longo de sucessivas gestações e pode resultar em abortamento ou o nascimento de bezerros saudáveis, mas congenitamente infectados; em caso de fêmeas, estas poderão transmitir verticalmente o parasita aos seus descendentes (Guido et al., 2016)

A transmissão vertical também ocorre em cães, em que cadelas subclinicamente infectadas podem transmitir *N. caninum* aos seus descendentes em ninhadas consecutivas; todavia, a infecção transplacentária por conta própria é possui menor relevância na manutenção da infecção em populações caninas (Dubey, Schares, 2011; Goodswen; Kennedy; Ellis, 2013).

2.3.3 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia de *N.caninum* é complexa e parcialmente compreendida. O *N. caninum* pode causar séria doença em cães, bovinos, búfalos, ovinos e

caprinos e ocasionalmente em outros animais, todavia, a doença clínica é rara (Dubey; Schares, 2011). O sinal clínico mais importante e evidente em vacas adultas é, de fato, o abortamento, que pode ocorrer em qualquer estágio de infecção, mais frequente na segunda metade da gestação (Alméria et al., 2010)

Alguns fatores demonstram influenciar a ocorrência do abortamento, tais como idade do animal, época da infecção, imunidade da mãe durante a gestação, dentre outros, definindo ou não a presença de animais soropositivos que podem ou não abortar. Igualmente, o mecanismo preciso pelo qual ocorre abortamento em infecções por *N.caninum* ainda é desconhecido (Almeria et al., 2010).

Na reprodução de bovinos os efeitos da infecção são caracterizados por mortalidade embrionária durante o primeiro terço gestacional, pode ocasionar abortamentos geralmente no segundo trimestre da gestação (entre o 5º e o 6° mês), fetos podem morrer no útero (natimortos) ou ser reabsorvidos, mumificados, autolisados, nascidos vivos com sinais clínicos ou nascidos clinicamente normal, mas persistentemente infectados apresentando sinais neurológicos (Dubey, 2005; Alméria; López-Gatius, 2015), ainda são relatados a ocorrência de doença uterina(retenção de placenta e metrite) (Pessoa et al., 2016) ,além de outras alterações reprodutivas, tais como, repetição de cio, infertilidade e baixo desempenho reprodutivo (Dubey et al. 1992, Gondim et al. 2004).

O abortamento é a principal manifestação clínica da doença, em que vários mecanismos podem levar a ocasioná-lo, destacando: o dano tecidual direto oriundo da multiplicação dos parasitas na placenta ou em tecidos fetais o que poderia levar a uma diminuição da passagem de nutrientes/oxigênio via placenta (Dubey et al., 2006). Em segundo lugar, lesões teciduais podem ocorrer através da ativação do sistema imune materno que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, óxido nítrico ou prostaglandinas na placenta (Buxton et al, 2002; Alméria; López-Gatius, 2015)

Estima-se que até 95% dos bezerros infectados congenitamente podem nascer clinicamente normais, todavia, também têm sido descritos casos de bezerros infectados congenitamente, que apresentaram manifestação neurológica como consequência da presença de cistos no SNC (Dubey; Lindsay, 1996).

Os sinais clínicos em bezerros com menos de quatro meses incluem sinais neurológicos, incapacidade de levantar-se e de manter o peso normal. Durante o exame neurológico pode ser observada a presença de ataxia, diminuição dos reflexos patelares e perda de propriocepção consciente. Além disso, assimetria nos olhos e exoftalmia podem estar presentes (Dubey; Schares, 2006).

Em cães congenitamente infectados a manifestação clínica mais comum é a neuromuscular gradual e progressiva, com paralisia ascendente e hiperextensão dos membros posteriores. A atrofia muscular, contratura e fibrose são evidenciadas em muitos casos. Sinais de polimiosite e doença multifocal do sistema nervoso central (SNC) podem acontecer isoladamente ou associados (Guido et al, 2016).

2.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose é difícil em virtude da falta de manifestações clínicas nos animais com infecção crônica, à dificuldade de isolamento de *N.caninum* no feto abortado, escasso número de parasitas e pelo aparecimento de abortamentos com ausência de outros sinais clínicos (Mota; Ferre; Faria, 2008).

Na maioria das vezes o diagnóstico laboratorial da Neosporose baseia-se no diagnóstico sorológico, histopatológico, molecular e isolamento (*in vivo* ou *in vitro*), o exame de fezes dos cães (Hemphill et al., 2000), assim como o uso adequado da investigação, dados obtidos no exame clínico e as lesões dos animais afetados (fêmeas que abortam e seus fetos) devem ser considerados, tendo em vista outras possíveis causas infecciosas (Dubey; Schares, 2006).

Os testes sorológicos são ferramentas importantes para determinar os títulos de anticorpos de *N.caninum* a partir de amostras de soro sanguíneo, plasma, leite de vacas infectadas, bem como em fluídos vaginais e na saliva (Ooi et al., 2000; Guido et al., 2016). Estes testes avaliam o contato do agente com o hospedeiro de forma específica, por meio da detecção de IgG e podem ser utilizados para a análises sorológicas em casos de abortamentos e em rebanhos bovinos para estudos epidemiológicos, uma vez que podem ser aplicados no diagnóstico *ante-mortem* e prover informações sobre o estágio da

infecção no rebanho (Dubey; Schares, 2006; Dubey; Schares, 2011). Níveis de anticorpos específicos podem permanencer durante toda a vida, mas flutuam e as vezes estão abaixo do limite de detecção dos testes sorológicos.

Dentre os métodos de diagnóstico incluem o teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoienzimático “enzyme-linked immunoabsorbent assay” (ELISA), DOT ELISA (Pinheiro et al. 2005), teste de aglutinação (NAT), ou immunoblotting, Western blot (Bjorkman; Uggla, 1999) (Dubey; Schares, 2006, Dubey; Schares, 2011).

A Reação de Imunofluorescência Indireta foi o primeiro método utilizado como forma de diagnóstico para *N.caninum* (Hemphill et al., 2000) e é considerada o teste referência no diagnóstico por apresentar boa sensibilidade e especificidade (Langoni et al., 2011), todavia, não há consonância para um valor de corte para ser usado como referência para o diagnóstico de neosporose. Do mesmo modo, este valor poderia ser afetada ainda pela idade do animal ou estágio da doença, a estratégia utilizada para o diagnóstico e condições de laboratório (Andreotti et al., 2009). A presença de elevados níveis de anticorpos pode ser indício de uma alta dose infectante e ou uma eficiente multiplicação do parasita no hospedeiro infectado. Em casos de infecção latentes, altos níveis de anticorpos podem ser indicativos de atividade de recrudescência de uma infecção existente (Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007).

A maioria dos ensaios imunoensimáticos utilizam como antígenos taquizoítas lisados, em que os valores de especificidade e sensibilidade variam de acordo com o *kit* comercial utilizado, ao tipo de antígeno, concentração, diluição do soro e do conjugado, e especificidade do conjugado para um isotipo em particular, determinando o aparecimento de distintos valores de absorbância dos diversos testes de ELISA do mercado (Dubey; Schares, 2006).

As provas de aglutinação direta (NAT – Nesopora Agglutination Test) atua através da degradação do 2 - mercaptoetanol expressando desta forma a IgG. A técnica possui uma sensibilidade de 97 a 99%, empregam poucos equipamentos e materiais, além de serem de fácil interpretação (Mota; Ferre; Faria, 2008).

Como método molecular importante no diagnóstico post-mortem em tecidos fetais, pode ser utilizada técnicas alternativas como a (PCR), técnica altamente específica e sensível para o diagnóstico de *N.caninum* (Yao et al., 2009). A avaliação de citocinas pró-inflamatórias como marcadores de exposição ao parasita, também poderia ser aplicada; Todavia, apresentam-se como indicadores transitórios de infecção e seu uso se limita ao campo da pesquisa (Guido et al, 2016).

O diagnóstico *post mortem* também pode ser baseado em avaliação histológica e imunoistoquímica de tecidos oriundos de fetos abortados. No exame histopatológico buscam-se as lesões que o protozoário causou nas células infectadas, sendo possível observa lesões microscópicas características no feto como encefalite necrosante multifocal não-supurativa; miocardite não-supurativa e, menos comumente, inflamação não-supurativa focal em outros órgãos, tais como músculo esquelético, fígado, pulmão e placenta (Regidor-Cerrillo et al., 2008)

Estruturalmente, esta tese encontra-se organizada em forma de três capítulos contendo artigos científicos completos e descrevem os resultados obtidos no presente estudo, sendo o primeiro intitulado “Frequência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em bovinos na microrregião de Floriano, Estado do Piauí”, escrito de acordo com as normas do periódico **Ciência Rural** (ISSN 1678-4596), o segundo intitulado “Análise soroepidemiológica e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em bovinos no estado do Piauí.” foi escrito segundo as normas do **Acta Scientiae Veterinariae (ISSN: 1679-9216)** e o terceiro sob o título “Pesquisa de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos e cães da microrregião de Floriano, Piauí”, que foi escrito conforme as normas da **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira** (**ISSN 1678-5150** - **versão on-line)**