

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

EDUARDO CAIRO RIBEIRO CUNHA

INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Leptospira spp.* e *Neospora caninum* EM
NOVILHAS DE CORTE.

UBERLÂNDIA
2018

EDUARDO CAIRO RIBEIRO CUNHA

INVESTIGAÇÃO DE INFECCÇÃO POR *Leptospira spp.* e *Neospora caninum* EM
NOVILHAS DE CORTE.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Anna Monteiro
Correia Lima

UBERLÂNDIA

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe por todo amor e perseverança, pois sem o seu apoio não chegaria até aqui. Aos meus avós maternos por toda a criação e ensinamentos transmitidos. Aos meus amigos, que me deram apoio e estímulo durante toda essa jornada. A minha orientadora, professora Dr^a Anna Lima por todo conhecimento, dedicação e paciência e por não desistir. Ao co-orientador Felipe Antunes, por toda prestatividade com o desenvolvimento do nosso trabalho. A toda a equipe do laboratório de infectocontagiosas, especialmente ao Danilo e Vinicius por toda ajuda na realização dos exames. Ao amigo de pesquisa Fausto, pelo trabalho e empenho. E para todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

A leptospirose e neosporose são doenças que geram grandes perdas econômicas na pecuária de corte, sendo que as principais manifestações clínicas observadas em rebanhos de bovinos são abortos, natimortos ou nascimento de bezerros fracos, repetição de cio e retenção de placenta. Por isso a identificação dos bovinos reagentes nos rebanhos é de suma importância para que se tenha uma tomada de decisão quanto a melhor estratégia de controle. Este estudo objetivou-se verificar a ocorrência de anticorpos anti- *Leptospira spp.* e anti- *Neospora Caninum* em novilhas de corte da fazenda Experimental Capim Branco localizada no município de Uberlândia, Minas Gerais. Foram testadas amostras de soro sanguíneo de 21 novilhas, da raça nelore que nunca receberam a vacina contra Leptospirose, utilizando-se do teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro para detecção de anticorpos anti- *Leptospira spp* e o teste de ELISA para detecção de anticorpos anti- *Neospora Caninum*. Este estudo foi dividido em duas coletas, sendo que a primeira antecedeu a estação de monta e a vacinação, e uma segunda coleta antecedendo a estação de parição. Obteve-se na primeira coleta 55,55% dos animais reagentes para pelo menos um sorovar de *Leptospira spp.* (1:100), enquanto que na segunda coleta 63% dos animais apresentaram reagentes para pelo menos um sorovar (1:100). Enquanto que os resultados do teste de ELISA foi 47,61% dos animais reagentes para *N. caninum* e de 88,88% dos animais reagentes para *N. caninum* na segunda coleta. Os resultados do exame de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de Leptospirose apresentados nesta titulação indicam que as novilhas entraram em contato com a bactéria, e produziram anticorpos *anti Leptospira spp*, mas pela titulação apresentada não é possível afirmar que os animais estão com a doença, embora os sinais clínicos de aborto, repetição de cio e nascimento de bezerros fracos conduzem a suspeita de doença reprodutiva instalada no plantel. Estes sinais clínicos podem ter sido agravados devido ao fato dos animais se apresentarem reagentes para *N. caninum*, parasita que afeta o trato reprodutivo de bovinos.

Palavras-chave: aborto; reprodução; bovinos de corte;

ABSTRACT

Leptospirosis and neosporosis are disorders capable of generating major economic losses for the beef cattle industry; the main clinical manifestations observed in cattle herds include abortions, stillbirths and weak calf, repeat breeding and retained placenta. For these reasons, the positive identification of these individuals among the cattle is important for making the most effective choices about control strategies. The present study intended to verify the occurrence of anti-*Leptospira* spp. and anti-*Neospora caninum* antibodies among cutting heifer on Capim Branco Experimental Farm, located in the municipality of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Twenty-one Nellore heifers, which were never submitted to leptospirosis vaccinated, had their blood serum tested with microscopic agglutination test (MAT), intending to detect anti-*Leptospira* spp. antibodies, and also with ELISA test, intending to detect anti-*Neospora caninum* antibodies. The study was divided into two collects; the first one preceded breeding season and vaccination, and the last one preceded birth season. At the first collect, 55.55% of individuals tested positive for at least one *Leptospira* spp serovar (1:100), whereas 63% tested positive at the last collect. Meanwhile, 47.61% of individuals tested by ELISA were positive for *N. caninum* at the first collect and 88.88% at the last collect. The MAT results for leptospirosis diagnosis indicate the individuals were in contact with the agent, therefore produced the anti-*Leptospira* spp. antibodies, but this concentration used in the experiment does not make it possible to establish if these individuals are carrying the actual disease, although the clinical signs of abortion, repeat breeding and weak calf lead to the suspect of a reproductive illness installed on the flock. Such clinical signs may be aggravated for the presence of these anti-*Leptospira* spp. and anti-*Neospora caninum* antibodies, considering these agents have direct effect on the reproductive tract in bovines.

Keywords: abortion; heifers; reproduction; bovines.

INDICE DE TABELAS

Tabela 1	Percentual de bovinos reagentes no exame de soroprecipitação microscópica na titulação de 1:100 de acordo com o sorovar	18
Tabela 2	Percentual de novilhas reagentes para Leptospirose, Neosporose e Leptospirose e Neosporose concomitantemente, referente a primeira coleta ...	18
Tabela 3	Percentual de novilhas reagentes para Leptospirose, Neosporose e Leptospirose e Neosporose concomitantemente, referente a segunda coleta ..	18
Anexo 1	Análise final nº 199/18 da comissão de ética na utilização de animais para o protocolo registro CEUA/UFU 027/18	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 INFECÇÕES DO TRATO REPRODUTIVO DA VACA	9
2.2.0 LEPTOSPIROSE	9
2.2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	9
2.2.2 PATOGENIA	10
2.2.3 TRANSMISSÃO	10
2.2.4 SOROVARES	11
2.2.5 DIAGNÓSTICO	11
2.2.6 SINAIS CLÍNICOS	12
2.2.7 CONTROLE E PROFILAXIA	12
2.3.0 NEOSPOROSE	13
2.3.1 ETIOLOGIA	13
2.3.2 CICLO BIOLÓGICO E HOSPEDEIROS	13
2.3.3 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO	14
2.3.4 LESÕES E SINAIS CLÍNICOS	14
2.3.5 DIAGNÓSTICO	15
2.3.6 CONTROLE E PROFILAXIA	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	24

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o Brasil é um país que apresenta grande potencial para produção de carne e leite, entretanto, apresenta valores médios de produção baixos, sendo que grande parte desses valores se deve a baixa fertilidade encontrada nos rebanhos nacionais (OLIVEIRA, 2008). Atualmente o Brasil possui mais de 218 milhões de bovinos, Minas Gerais representa aproximadamente 11% do rebanho nacional e o país vem se destacando como um grande exportador de carne bovina (IBGE, 2018).

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa que afeta animais e seres humanos, sendo por isso considerada uma zoonose (CÔRTEZ, 1983). Sua ocorrência é descrita em todo o mundo, porém possui uma maior prevalência naqueles países que estão na zona tropical, devido às condições ambientais e climáticas serem propícias para a manutenção e disseminação do agente causador (BLENDEN, 1975).

As principais manifestações clínicas de leptospirose observadas em rebanhos de bovinos são abortos, natimortos ou nascimento de bezerros fracos, repetição de cio e retenção de placenta, representando uma grande perda econômica (YAEGER e HOLLER, 2007).

A neosporose bovina é uma doença de origem parasitária, causada pelo protozoário *Neospora caninum*, que gera grande impacto econômico devido aos sinais clínicos apresentados, sendo o aborto o de maior relevância. A via de transmissão vertical (transplacentária) é a principal forma de infecção do rebanho, responsável pela persistência do *N. caninum* no plantel (DIAS et al., 2014).

Objetivou-se avaliar a ocorrência de anticorpos *anti-Leptospira spp* e *anti- Neospora Caninum* em novilhas nelore da fazenda experimental Capim Branco da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, e comparar com índices reprodutivos, a fim de diagnosticar esta enfermidade, e sugerir ações para melhorar o controle sanitário e o desempenho reprodutivo do rebanho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções do trato reprodutivo da vaca

Uma das principais dificuldades que impactam negativamente na pecuária bovina são as afecções que acometem o trato reprodutivo, chocando diretamente com o desempenho produtivo do rebanho. Para a avaliação da eficiência reprodutiva do rebanho podem ser utilizados vários parâmetros, que por vez podem ser prejudicados por infecções, ocasionadas por um micro-organismo, ou por infecções múltiplas. Dentre os principais parâmetros utilizados destacam-se intervalo entre partos; taxa de retorno ao cio; taxa de abortamento; número de doses de sêmen por prenhez positiva (ALFIERI; ALFIERI, 2017).

Dentre as falhas da reprodução na pecuária bovina, 50% aproximadamente podem ser consideradas de origem infecciosa. Sendo que as mais variáveis formas de apresentações clínicas podem estar relacionadas a mais de um patógeno envolvido, de forma que apresentação do sinal clínico se dá por meio de problemas reprodutivos, impossibilitando o diagnóstico clínico. Sendo assim, o diagnóstico final, se dá somente por meio de técnicas de identificação do agente etiológico e técnicas de laboratoriais de sorologia (Cortez et al., 2006).

2.2 Leptospirose

2.2.1 Agente Etiológico

As leptospirosas são bactérias em formas de espiroquetas, com cerca de 0,1 µm de diâmetro por 6 a 20 µm de comprimento. São microorganismos que compõem o gênero *Leptospira*, pertencentes à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (FAINE et al., 1999).

Antigamente acreditava-se que apenas a espécie *Leptospira interrogans* seria patogênica, atualmente a família Leptospiraceae está divididas em 13 espécies patogênicas de Leptospirosas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffi*, agrupadas em 23 sorogrupos e em mais de 260 sorovares (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

São microorganismos que em condições favoráveis de temperatura, umidade (ótima de 28-30°C) e pH ideal (7,2 a 7.4) sobrevivem por até 180 dias no meio

ambiente. Alguns sorovares demonstram afinidade pelo hospedeiro, porém não são considerados hospedeiros-específicos (KRIEG, 1986).

2.2.2 Patogenia

As leptospiros conseguem penetrar ativamente no hospedeiro por meio da pele e das mucosas (OLIVEIRA, 1984). Estas bactérias possuem a capacidade de penetrar tanto na pele lesada, como na pele íntegra, devido a movimentos semelhantes a saca rolha e a produção de hialuronidase (VOLLAND e BREDE, 1952).

Ocorre, então, um período de bacteremia que começa de um a dois dias após a infecção e pode durar até uma semana, sendo que anticorpos circulantes serão detectáveis após 10 a 14 dias. Passado o período de bacteremia, as leptospiros poderão ser encontradas nos rins, especificamente nos túbulos proximais, local onde ocorre a multiplicação e excreção via urina (ADLER, 2015). A multiplicação nos túbulos proximais ocorre devido à ausência de fagócitos na urina (leptospiúria). Assim sendo, animais infectados tornam-se portadores renais (PLANK, 2000).

A duração e intensidade deste derramamento urinário vão variar de acordo com a espécie animal e sorovar, podendo durar dois anos ou mais. Há estudos que relatam que a intensidade de excreção é maior no primeiro mês após a infecção (BOLT e MARSHALL, 1995).

As Leptospiros podem se localizar no útero de fêmeas gestantes resultando em abortos, natimortos, nascimento de bezerras fracas e geralmente está associada ao terço final de gestação. A patogênese da doença reprodutiva ainda é pouco conhecida (ADLER, 2015).

2.2.3 Transmissão

A transmissão pode ocorrer por via direta ou indireta. Sendo que a urina a principal via de transmissão quando se trata de Leptospirose, entretanto, em bovinos, outras formas de eliminação do agente incluem descargas uterinas pós-abortamento, feto ou placenta infectada, corrimentos vaginais e sêmen, vias que acabam sendo tão importante quanto à via urinária. Existem ainda as formas de transmissão indireta que consiste á exposição do animal à um ambiente contaminado (ELLIS, 1994).

2.2.4 Sorovares

Em bovinos o sorovar Hardjo é constantemente encontrado, outros sorovares são comumente encontrados também, como o Pomona e Grippotyphosa. Dentre o sorovar Hardjo, pode ser geneticamente dividido em Hardjbovis e Hardjoprajtno, sendo que o primeiro descrito em todo o mundo, e o segundo isolado primeiramente de bovinos no Reino Unido (GROOMS, 2006).

Existem alguns fatores de risco que devem ser levados em conta quando se trata da disseminação do sorovar Harjo. Dentre eles estão o acesso a cursos d'águas contaminados, tamanho do rebanho, práticas errôneas de criação e compra de reprodutores, dentre outras (RYAN et al. 2012).

2.2.5 Diagnóstico

Devido à leptospirose apresentar-se de forma bastante inespecíficas, o diagnóstico clínico é dificultado, sendo assim, faz com que seja necessário o uso de técnicas laboratoriais para chegar a um diagnóstico (PINTO, 1997). O diagnóstico para leptospirose pode ser feito através da detecção direta do micro-organismo pelo isolamento de leptospiras em culturas ou então pela detecção de anticorpos específicos (HARTSKEERL et al. 2011).

As técnicas sorológicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial permitem o conhecimento prévio do perfil epidemiológico do rebanho, porém são raras as ocasiões em que a sorologia poderá ser utilizada para diagnóstico definitivo. Em grande parte das infecções que acometem o trato reprodutivo feminino, o diagnóstico confirmatório se dá somente por meio de técnicas laboratoriais que possibilitem a identificação do agente etiológico ou de seus componentes (JUNQUEIRA et al., 2006).

Dentre as técnicas laboratoriais que consistem na detecção de anticorpos, a prova de soroaglutinação microscópica (MAT) é o exame de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde (FAINE et al., 1999). Esse teste baseia-se na reação de antígenos de natureza lipopolissacarídica, advindos da superfície das leptospiras e os respectivos anticorpos (BALDWIN et al. 1987).

O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) possui alta especificidade, contudo este exame apresenta algumas limitações: não consegue diferenciar títulos de animais vacinados e não vacinados, ocorrência de reações cruzadas entre sorovares, a sensibilidade declina de acordo com o tempo de

infecção e pode não identificar algumas infecções latentes (WILLIAN e BERNARD, 1995).

2.2.6 Sinais clínicos

Geralmente, quando há infecção em hospedeiros acidentais (como o homem), a *Leptospira* spp causa um quadro clínico severo, associada a altos títulos de anticorpos aglutinantes. Sendo que os sinais clínicos variam de acordo com a susceptibilidade do hospedeiro e com o sorovar infectante (FAINE et al., 1999).

Em bovinos a doença se manifesta de duas formas: aguda e crônica. A primeira não é comum e geralmente está ligada a animais jovens infectados por cepas pertencentes aos sorogrupos Pomona, Icterohaemorrhagie e Grippotyphosa. Os animais infectados apresentam sinais clínicos como anemia hemolítica, hemoglobinúria e icterícia (ADLER, 2015). Já a leptospirose crônica apresenta como principais formas de manifestação o aborto, natimorto, parto prematuro e nascimento de bezerros fracos, que representa uma grande perda econômica se tratando de bovinocultura (ELLIS et al. 1985).

2.2.7 Controle e Profilaxia

O controle da leptospirose depende da diminuição da prevalência de infecção com sorovares mantidos no rebanho e redução do grau de associação ecológica das leptospirosas reservadas por animais de vida livre (HATHAWAY et al., 1986).

Segundo De Nardi (2005), o controle da leptospirose baseia-se na vacinação sistemática do rebanho, controle dos roedores que são importantes reservatórios, tratamento dos animais doentes com antibioticoterapia e eliminar excesso de água do ambiente.

Pereira et al., (2013) citam que para o controle de leptospirose no rebanho recomenda-se a vacinação em período imediatamente anterior ao início da estação de monta, seja por meio de monta natural, IA, ou IATF. Com esse manejo, faz com que os casos de mortalidade embrionária, e até mesmo tardia diminuam. Entretanto, as vacinas utilizadas para o controle de leptospirose bovina mantêm níveis adequados de imunidade de no máximo seis meses, sendo necessárias as revacinações em um período semestral.

2.3 Neosporose

2.3.1 Etiologia

O agente etiológico que causa neosporose em bovinos é o *Neospora caninum*, considerado um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriose, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (OSHIRO et al., 2007).

2.3.2 Ciclo biológico e hospedeiros

O *N. caninum* possui um ciclo de vida do tipo heterógeno com a reprodução sexuada ocorrendo no hospedeiro definitivo, e nos hospedeiros intermediários a reprodução assexuada (MCALLISTER et al., 1998). Sendo que os hospedeiros definitivos conhecidos hoje em dia são o cão doméstico, o coiote, o lobo cinzento e o dingo (GOODSWEN et al., 2013).

Sabe-se que as formas infectantes de *N. caninum* são os taquizoítos, os cistos teciduais contendo bradizoítos em seu interior e os oocistos (DUBEY et al., 2002).

O parasita se apresenta de três formas: taquizoítos, bradizoítos e oocistos. Quando está na forma de taquizoítos, o parasita se encontra dentro da célula do hospedeiro intermediário e está associado à fase aguda da infecção. Possui conformação de meia lua e medem cerca de seis micrômetros de comprimento por 2 micrômetros de largura. Geralmente são encontrados em macrófagos, células do endotélio vascular, células túbulo renal e hepatócitos. Nesta fase possui reprodução assexuada, dividindo-se rapidamente e causando lise celular (DUBEY et al., 2007).

A infecção no hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de carne contaminada com cistos contendo bradizoítos e por transmissão placentária. (NEGRÃO; LOPES, 2006). Cerca de cinco dias após a primeira infecção ocorre a liberação de oocistos não esporulados nas fezes, sendo que a esporulação destes oocistos ocorre vinte e quatro horas após a sua eliminação (ALMERÍA; LÓPEZ, 2013).

Já os hospedeiros intermediários se infectam após a ingestão de pastagens ou água contaminada. No intestino, são liberados os esporozoítos infectantes que adentram a parede intestinal, transformando-se em taquizoítos,

dividindo-se rapidamente, causando lise celular e propagando a infecção (LINDSAY et al., 1999).

Ocorre também a transmissão vertical, onde os taquizoitos são transmitidos da mãe para o feto via placenta, esta infecção fetal pode gerar o aborto (GOODSWEN et al., 2013).

2.3.3 Epidemiologia e fatores de risco

Segundo LLANO (2013) a neosporose bovina está distribuída de forma cosmopolita, e o conhecimento epidemiológico desta doença é de grande importância.

Através de estudos epidemiológicos constataram-se os cães como um fator de risco para ocorrência de neosporose. Sendo que as propriedades localizadas próximas às vilas e cidades possui mais prevalência de bovinos infectados, apontando um fator de risco potencial (SÁNCHEZ et al., 2003). O cão possui comportamento carnívoro, ingerindo carcaças de bovinos, restos placentários e fetos, devido a esse comportamento, há uma alta prevalência de cães de fazenda infectados com *N. caninum*. (CARDOSO, 2010).

Outros fatores de risco que pode ser atribuído a neosporose é a criação de aves domésticas, fornecimento de silagem e o tamanho da propriedade (CHIEBAO, 2010).

2.3.4 Lesões e sinais clínicos

Geralmente lesões inflamatórias generativas são encontradas em sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético e cardíaco e fígado, podem ser encontradas em tecidos fetais com menor incidência. (BARR et al., 1991). Lesões localizadas no SNC consistem em encefalomielite não supurativa caracterizada por infiltração multifocal, podendo ter ou não necrose. Sendo que a lesão característica de infecção por *N. caninum* no encéfalo consiste em um foco central de necrose com células mononucleares em torno (DUBEY et al., 2006).

Em vacas infectadas por *N. caninum*, observa-se a ocorrência de repetição de cio, natimortos e abortos, sendo que o aborto possui maior casuística, que geralmente ocorre entre o quinto e sétimo mês de gestação, podendo ocorrer tanto em vaca como novilhas, e pode apresentar-se de forma esporádica, endêmica ou epidêmica em qualquer época do ano (ÁLVARES-GARCIA, 2003). Quanto aos

bezerros que chegam a nascer infectados, podem apresentar peso reduzido, sintomatologia nervosa e dificuldade em se locomover (FERRE et al., 2003).

2.3.5 Diagnóstico

Segundo Oshiro (2007), o diagnóstico de neosporose bovina se inicia com a anamnese, avaliação do histórico do rebanho, sinais clínicos observados e realização de exames complementares. Para que se tenha a confirmação do diagnóstico se faz necessário o uso de técnicas laboratoriais.

Existem técnicas laboratoriais para a identificação direta do protozoário, como técnicas histopatológicas, imunoistoquímica (IHQ), isolamento em cultivo celular ou em camundongos, e técnicas sorológicas como aglutinação direta, ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) (DUBEY e SCHARES, 2011).

Kato (2009) citou que em criações onde há suspeita de neosporose, é indicado que se faça uma investigação sorológica por amostragem, englobando 10% do rebanho. Sendo que nas amostras deve conter vacas que abortaram e animais de sua ascendência, descendência, colaterais e aqueles animais que não sofreram aborto.

Para o diagnóstico em animais vivos, preconiza-se a escolha de exames de sorologia. Sendo que os testes mais utilizados são imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (ELISA). O IFI emprega anticorpos anti-*N. caninum* secundários específicos conjugados a um fluorocromo, enquanto que o ELISA utiliza-se enzimas (LLANO 2013).

O teste ensaio imunoenzimático é o principal método indireto utilizado para diagnóstico sorológico. Apresentando algumas vantagens em relação ao método de IFI, como a maior objetividade na interpretação dos resultados e maior rapidez na realização de maior número de exames (BJÖRKMAN et al., 2006).

2.3.6 Controle e profilaxia

Para a prevenção de neosporose bovina é fundamental um controle sanitário sistemático e um manejo correto do rebanho (PATRICÍO, 2008). É necessário dar uma atenção especial para os hospedeiros definitivos, que são responsáveis pela transmissão horizontal da doença, realizando um controle na população destes (DUBEY et al., 2007).

Uma forma de controle é a realização do abate seletivo de animais soropositivos, como forma de controlar a perpetuação da infecção no rebanho. Porém, a priori pode ser economicamente inviável devido à alta prevalência da enfermidade no rebanho (CARDOSO, 2010).

Rojo-Montejo et al. (2013) desenvolveram uma vacina à partir de um novo isolado de *N. Caninum*, obtido à partir do encéfalo de uma bezerra infectada congenitamente. O grupo de camundongos que receberam a imunização de 5×10^5 taquizoitos apresentaram uma transmissão vertical de apenas 2,3%, enquanto que o grupo que não recebeu a imunização, a transmissão vertical foi de 89,1%.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Objetivou-se verificar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* e anti-*Neospora caninum* em novilhas nelore criadas a pasto.

3.2 Objetivos específicos

Conhecer o perfil epidemiológico da leptospirose e neosporose na fazenda experimental Capim Branco da Universidade Federal de Uberlândia.

Avaliar títulos sorológicos após vacinação para leptospirose e comparar com índices reprodutivos em novilhas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi previamente submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, sob o protocolo nº 027/18 (Anexo 1). A pesquisa foi realizada na fazenda experimental Capim Branco da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. A fazenda está localizada em uma região que apresenta altitude média de 863 metros, situando-se aproximadamente a 18° 55' 207' de latitude sul e a 48° 16' 38'' de longitude oeste de Greenwich. O clima predominante é classificado como tropical de altitude, ou seja, com temperaturas amenas e chuvas classificadas em duas estações: úmida e seca. Conforme a classificação de Köppen, o clima é classificado como "Cwa" mesotérmico úmido subtropical de inverno seco, com temperatura média em torno de 23°C, com máximas históricas por volta de 37,4°C e mínimas de 1°C. O regime pluviométrico é o regime tropical, isto é, chuvas de verão iniciando-se em outubro/novembro (estação úmida) e tornando-se mais raras a partir de março/abril (estação seca) apresentando uma precipitação acumulada média de 1870 mm anuais (UBERLÂNDIA, 2016).

Este estudo foi dividido em duas coletas, a primeira que foi realizada dia 31 de outubro de 2017, antecedendo a estação de monta. E uma segunda coleta que foi realizada dia 20/09/18.

Foram coletadas amostras de sangue de 21 novilhas da raça Nelore, com peso corporal médio de 360 kg, e idade média de 24 meses, criadas a pasto em conjunto com outras 59 vacas.

A coleta foi feita por meio de punção de veia coccígea, para a coleta, utilizou-se uma agulha estéril por fêmea e um tubo a vácuo sem anticoagulante previamente identificado. O material coletado foi transportado sob-refrigeração para o laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Após a coleta de sangue, os animais foram vacinados contra rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR, herpesvírus bovino tipo 1), diarreia viral bovina (BVD), parainfluenza tipo 3 (PI3), vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) e *Leptospira interrogans*.

No laboratório foi feita a extração do soro sanguíneo de cada amostra por meio de centrifugação, em um prazo de 2 minutos. O soro foi colocado em microtubos devidamente identificados e posteriormente armazenados em uma temperatura de -20°C até a realização dos exames.

Para a detecção de anticorpos anti-*L. Interrogans* para 22 sorovares, Australis, Autumnalis, Batavie, Brasiliensis, Bratislava, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Guaricura, Grippotyphosa, Hardjoprajitino, Hebdomadis, Icterohaemorrhagie, Javanica, Panama, Pomona, Sjroe, Shermani, Tarassovi, Wolffii. Utilizou-se o método de soroprecipitação microscópica (MAT), teste de referência para Organização Mundial da Saúde-OMS.

Para realização do teste de MAT colocou 2,45 ml de solução salina em tubos de ensaio médio e acrescentou 50 µl de soro da amostra ao tubo e homogeneizou. Em uma placa de fundo chato, na vertical identificou-se com letras de A a Z que corresponde aos 22 sorovares e na horizontal, enumerou-se (1,2,3,4,5...) conforme a quantidade de amostras. Adicionou-se 50 µl da solução que foi homogeneizada em cada poço (A a Z). Na capela de exaustão devidamente limpa, pipetou de 1 a 2 ml de cada sorovar, dependendo da quantidade de amostras, e colocou em 22 tubos de ensaio pequenos devidamente identificado de A a Z. Colocou 50 µl de cada sorovar no poço correspondente da placa de fundo chato, e aguardou 1 hora para leitura no microscópio, a titulação foi feita para os animais positivos (BRASIL, 1995).

Segundo Brasil (1995) padroniza-se animais soropositivos os títulos maiores ou iguais a 50% de antígenos aglutinados por campo em uma diluição de 1:100 do soro sanguíneo.

Os animais que apresentaram soropositivos na titulação de 1:100, foram testados para obter-se a determinação final no título de aglutininas antileptospiras, foram feitas diluições seriadas em escalas geométrica de razão de dois em solução salina acrescentando 50 µl do antígeno que reagiu como positivo na triagem.

Para a detecção de anticorpos anti- *Neospora caninum* foi utilizado o método de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizados para detecção de anticorpos IgG específicos e frações antigênicas.

Para a realização do método de ELISA, pode ser dividido em 8 etapas. A primeira etapa é a de sensibilização, para isso foram utilizadas microplacas de alta afinidade, sensibilizadas com antígenos de *Neospora Caninum* (10 µg/ml) em tampão carbonato de sódio 0,06M (pH 9,6) à 4° C durante 18 horas. Após a sensibilização, os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), repetiu essa etapa 3 vezes. Cada placa foi incubada com as amostras de soro em duplicata na diluição 1:200 em PBS-T molico 5% por 1 hora a 37° C. Então lavou as placas com solução PBS contendo 0,05% Tween 20 durante 6 vezes. Subsequentemente, à placa foi adicionado anticorpos secundário IgG de coelho anti-IgG de bovino na diluição 1:20000 diluído em PBS-T molico 1%. Novamente lavou as placas com solução PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) durante 6 vezes. A reação foi desenvolvida através da adição do substrato enzimático (50 µL/poço) e a leitura da densidade óptica foi obtida a 405 nm, em leitor de placas.

Dois soros positivos e três soros negativos obtidos a partir de animais sabidamente infectados ou não com *N. Caninum* foram incluídos em cada placa de ELISA como controle positivo e negativo da reação. Sendo que o cut off das reações foram calculados a partir da média da densidade óptica para os soros controle, acrescido de três desvios-padrão. Os títulos de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE).

A reprodução nesta propriedade foi feita por meio de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram realizados três protocolos no período de novembro de 2017 a fevereiro de 2018. O diagnóstico de gestação foi feito por meio de ultrassonografia 30 dias após a inseminação artificial. Aquelas que se mantiveram não prenhe após o primeiro protocolo foi realizado um segundo

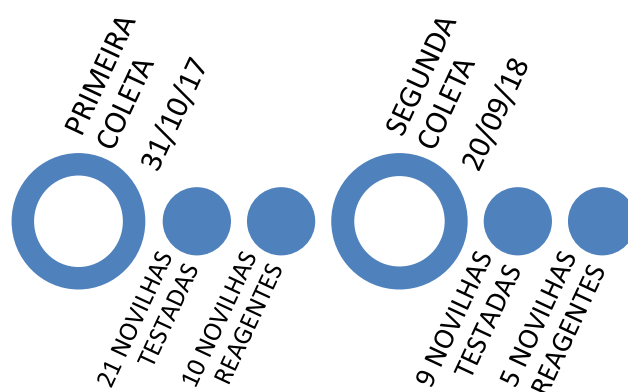
protocolo e repetiu o processo e as que ao término do terceiro protocolo não confirmou prenhes foram descartadas.

Os exames de todas as novilhas que estão aptas à reprodução, foram utilizados nesta pesquisa empregando estatísticas não paramétricas com percentual simples. Os resultados obtidos a partir dos exames laboratoriais serão acareados com índices reprodutivos como aborto, repetição de cio, natimorto, dentre outros.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão esquematizados na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática do período de pesquisa de novilhas reagentes à *Leptospira spp.*



Dentre as 21 amostras submetidas ao exame de MAT realizados após à primeira coleta, resultou em uma prevalência de 47,61% das novilhas reagentes para pelo menos 1 sorovar na titulação de 1:100. Ainda, 19% das novilhas apresentaram reagentes para mais de 1 sorovar na titulação de 1:100 (Tabela 2).

Já na segunda coleta não foi possível a realização do exame de MAT para as 21 amostras iniciais, devido 7 animais terem sido descartados por não obterem um bom desempenho reprodutivo e 5 animais por não estarem presentes no momento da coleta. Das 9 amostras, obteve-se um resultado de 55,55% das novilhas reagentes para pelo menos 1 sorovar na titulação de 1:100. Enquanto que 22,22% dos animais apresentaram reagente para mais 1 sorovar na titulação de 1:100 (Tabela 3).

Dentre as 21 amostras testadas no exame de MAT na primeira coleta, 28,57% dos animais reagiram para o sorovar Pomona e Sejroe, seguido por Wolffi, com 9,5% dos animais reagentes, e os sorovares Autumnalis, Australis e Tarassovi todos com 4,7% dos animais reagentes.

Os resultados obtidos na segunda coleta se apresentaram da seguinte forma, 33,3% das novilhas se apresentou reagentes para o sorovraes Tarassovi, 22,2% das novilhas apresentaram reagentes para os sorovares Australis e Icterohaemorrhagiae e 11,1% das novilhas apresentaram reagentes para o sorovar Wolffi (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentual de bovinos reagentes no exame de MAT na titulação de 1:100 de acordo com o sorovar, Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

SOROVAR	1ª COLETA n (%)	2ª COLETA n (%)
AUSTRALIS	1(4,7)	2(22,22)
AUTUMNALIS	1(4,7)	0
GRIPPOTYPHOSA	0	0
ICTERHAEMORRAGIAE	0	2(22,2)
POMONA	6(28,57)	1(11,1)
SEJROE	6(28,57)	0
TARASSOVI	1(4,7)	3(33,33)
WOLFFI	2(9,5)	0

Quanto ao exame de ELISA realizado para detecção de anticorpos anti- *Neospora Caninum*, foram testadas 21 amostras referente a primeira coleta, obteve-se um resultado de 10 (47,61%) das novilhas positivas. Na segunda coleta, dentre as 9 amostras testadas, 8 (88,88%) dos animais mantiveram positivos.

Tabela 2 – Percentual de novilhas reagentes para Leptospirose, Neosporose e Leptospirose e Neosporose concomitantemente, referente a primeira coleta, Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

	Leptospirose n (%)	Neosporose n (%)	Leptospirose e Neosporose n (%)
POSITIVO	10 (47,61)	10 (47,61)	2 (9,52)
NEGATIVO	11 (52,38)	11 (52,38)	19 (90)
Total	21	21	21

Tabela 3 – Percentual de novilhas reagentes para Letospirose, Neosporose e Leptospirose e Neosporose concomitantemente, referente a segunda coleta, Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

	Leptospirose n (%)	Neosporose n (%)	Leptospirose e Neosporose n (%)
Positivo	5 (55,55)	8 (88,88)	5 (55,55)
Negativo	4 (44,45)	1 (11,11)	4 (44,45)
Total	9	9	9

Na segunda coleta sete animais não estavam mais presentes na fazenda, foram descartados devido ao histórico de repetição de cio, destes 3 (42,85%) animais haviam sido reagentes no teste de MAT na primeira coleta e 2 (22,22%) reagiram no teste de ELISA. Destas 7 novilhas descartadas, nenhuma reagiu para *Leptospira spp.* e *Neospora Caninum* simultaneamente.

Cortez et al. (2006) citaram que dentre as falhas da reprodução na pecuária bovina, 50% aproximadamente podem ser consideradas de origem infecciosa.

Observou-se que a soroprevalência na segunda coleta foi maior que na primeira. Pode ser devido a introdução da vacina contendo algumas cepas de *Leptospira spp.* Em contra partida o número de amostras testadas na segunda coleta foi inferior ao da primeira, diminuindo a acurácia.

Após o encerramento da estação de monta, dentre as 21 novilhas que foram inseminadas, 14 foram diagnosticadas prenhes, e 7 diagnosticadas como vazias. Obteve-se então 70% do lote prenhe.

Dentre as 14 novilhas que ficaram gestantes, 13 finalizaram a gestação, enquanto que 1 novilha abortou. Esta mesma novilha se apresentava reagente para o sorovar Sjroe e negativa para neosporose na primeira coleta. No primeiro diagnóstico de gestação realizado no mês de abril de 2018, a mesma se apresentava prenhe, enquanto que no diagnóstico de gestação realizado no mês de setembro de 2018 a mesma foi diagnosticada como não gestante. Significando uma taxa de abortamento de 7,14%.

Oliveira et al. (2009) realizaram um estudo em fêmeas bovinas sadias, com idade acima de 24 meses, pertencentes a fazendas localizadas no estado da Bahia, onde encontrou uma prevalência de 45,42%, semelhante do que foi

encontrado no presente trabalho. Já Mineiro et al. (2011) encontraram 38% de soropositividade para leptospirose no Estado do Piauí.

Herrmann et al. (2012) identificaram 38,75% de animais reagentes para pelo menos 1 sorovar na região do Rio Grande do Sul, números próximos encontrados neste estudo. Enquanto que Marques et al., (2010) realizou um estudo na região do Goiás onde foram testadas 4.571 amostras e 62% dos animais deram reagentes no exame de MAT.

Silva (2011) realizou um trabalho no estado do Maranhão, onde foram analisadas 4.832 fêmeas bovinas, e obteve 35,94% dos animais reagentes a pelo menos uma sorovariedade de *Leptospira spp* com títulos variando de 100 a 6400.

Sartor et al. (2005) fizeram um trabalho onde pesquisou a ocorrência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos de leite e corte no interior de São Paulo, onde houve uma prevalência que variou de 7,7% a 87,5% de animais sororeagentes.

Ragozo et al (2003) pesquisaram a ocorrência de anticorpos anti- *Neospora Caninum* em 6 estados brasileiros. Dos 802 exames sorológicos realizados, encontrou uma ocorrência de 23,6% dos animais sororeagentes. Foram testadas 162 amostras do estado de Minas Gerais, obteve-se 47 animais soropositivos, significando uma prevalência de 29%.

De acordo com Pereira et al. (2013) a vacinação do rebanho contra leptospirose imediatamente antes da estação monta, seja ela por monta natural ou protocolos de inseminação artificial faz com que as mortes embrionárias, e até mesmo tardia, diminuam. Sendo que para que se tenha níveis adequados de imunidade é recomendado que se faça a revacinação a cada seis meses.

Como forma de controle da neosporose em rebanhos infectados Cardoso (2010) citou o abate seletivo de animais soropositivos, como forma de controlar a perpetuação da infecção no rebanho. Entretanto, devido à alta prevalência de animais reagentes no rebanho estudado, não se torna uma forma economicamente viável de controlar esta doença.

Dubey et al. (2007) citaram como forma de controle da neosporose, o controle na população de cães na propriedade, já que estes são responsáveis pela transmissão horizontal da doença. Além disso, é fundamental um controle sanitário sistemático e um manejo correto do rebanho.

Para que haja um bloqueio no ciclo natural biológico do parasita é necessário evitar o contato entre cães e bovinos na fazenda (SUN et al., 2015). A eliminação correta de fetos e restos placentários é fundamental para evitar que cães se contaminem (GHALMI et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do exame de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico de Leptospirose apresentados nesta titulação indicam que as novilhas entraram em contato com a bactéria, e produziram anticorpos, mas pela titulação apresentada não foi possível afirmar que os animais estão com a doença, embora os sinais clínicos de aborto, repetição de cio e nascimento de bezerros fracos conduzem a suspeita de doença reprodutiva instalada no plantel. Estes sinais clínicos podem ter sido agravados devido ao fato dos animais se apresentarem reagentes para *N. caninum*, parasita que afeta o trato reprodutivo de bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, Ben. History of leptospirosis and leptospira. In: **Leptospira and Leptospirois**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015. p. 1-9
- ADLER, Ben; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, Alejandro. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ALFIERI, Amauri A.; ALFIERI, Alice F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte.[Internet]**, v. 41, n. 1, p. 133-139, 2017.
- Almería S, López-Gatius F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. **Researc.Vet Scien**.2013
- ÁLVARES-GARCÍA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de Neospora caninum com interés inmunodiagnóstico em bovinos**. 2003. 301f.Tese (Doutorado) – Departamento de sanidade Animal. Facultad de Veterinária, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- BALDWIN, C. J.; ATKINS, C.E. Leptospirosis in the dog. **Compêndio Continuado de Educação e Prática Veterinária**, v. 9, n.5, p. 499-508, 1987.
- BLENDEN, D. C. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. **8ª Reunion Interamericana sobre el Controle de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis, Guatemala**, p. 160-168, 1975.
- BOLT, I.; MARSHALL, R. B. The epidemiology of *Leptospira interrogans* serovar pomona in grower pig herds. **New Zealand veterinary journal**, v. 43, n. 1, p. 10-15, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de leptospirose**. Brasília:, 98 p. 1995.
- CARDOSO, José Márcio Sbruzzi. **Aspectos epidemiológicos da infecção por Neospora caninum em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CHIEBAO, D. P. **Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum, anti-Brucella abortuse anti-Leptospira spp. em bovinos do Estado do Pará: estudo de possíveis variáveis para ocorrência de infecção**. 2010. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CORTEZ, A. et al. Detecção de ácidos nucléicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal Detection of *Brucella* spp., *Leptospira* spp., bovine herpesvirus and bovine viral diarrhea virus nucleic acids in aborted fetuses and bovines dead perinatal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1226-1228, 2006.

DE NARDI, G. **Perfil sorológico de anticorpos anti- *Leptospira* spp. Em búfalos (*Bubalus bubalis*) vacinadas com tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose (*Bacterina e Membrana externa*)**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

DIAS, L.R.O; FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES D.T.; VIU, A.F.M. Doenças parasitárias reprodutivas em bovinos-Neosporose. **PUBVET**, v. 8, p. 0230-0339, 2014.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.;BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W.. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 267–289, 2006.

Dubey J.P.; Schares G, Ortega-Mora ML. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Am Soc Microbiol**. 2007.

ELLIS, W. A. et al. Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. **The Veterinary Record**, v. 117, n. 5, p. 101-104, 1985.

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

FAINE, S. ADLER, BOLIN, C. PEROLAT, P. **Leptospiras and leptospirosis**. 2ª. ed. Austrália: MediSci, 1999.

FERRE, I.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, F. J.; ORTEGA-MORA, L. M. Diagnóstico de la infección y del aborto causado por *Neospora caninum* en los bovinos. **Producción Animal**, v.190, p. 52-62, 2003.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, n. 66, p. 624-628, 2006.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

HATHAWAY, S.C.; LITTLE, T.W.A.; PRITCHARD, D.G. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations. **Veterinary Record**, v.119, p.84-86, 1986.

HERRMANN, G.P.; Soroprevalencia de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 131-138, 2012.

JUNQUEIRA, J. R. C.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira Hardjo*. **Semina: Ciência Agrárias**, Londrina, v.27, n.3, p.471-480, 2006.

KATO, D. M. P. **Neosporose bovina**. 33f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Bovinos) – Universidade Castelo Branco, Piracicaba, 2009.

KRIEG, N. R., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.

LLANO, H. A. B. **Neosporose bovina**. 2013. 46f. Seminário (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GHALMI, F.; CHINA, B.; GHALMI, A.; HAMMITOUCHE, D.; LOSSON, B. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. **Research in Veterinary Science, Kidlington**, v. 93, p. 655–661, 2012.

GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution, Volume 13**, Jan, p. 133–150. 2013.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**, Nova Iorque, v. 28, n. 9, p. 1473-8, 1998.

MINEIRO, A.L.B.B.; Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 859-866, 2011.

NEGRÃO, C. B.; LOPES, M. D. **A importância do *Neospora caninum* na reprodução de bovinos**. 2006. 29 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Reprodução, Unesp-campus de Botucatu, Botucatu - Sp, 2006.

OLIVEIRA, F. C. S. **Leptospirose bovina no Estado da Bahia Brasil. Prevalência, sorovares predominantes, distribuição espacial e fatores de risco**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, F.C S. et al. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009.

OLIVEIRA, S. J, SARAIVA, D. Et al. **Bacteriologia Especial**. Porto Alegre, RS: Sulina, 1984. Cap. 39, p.463-483, 1984.

- OSHIRO, L. M.; MATOS M. F. C.; OLIVEIRA, J; MONTEIRO, L. A. R. C; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-Neospora caninum antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 133-138, 2007.
- PATRÍCIO, M. A. C. **Investigação de neosporose em encéfalos de bovinos pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com quadro de encefalopatia e diagnostico negativo para raiva no estado do Paraná, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- PINTO, C. M. **Utilização do papel de filtro para o transporte de amostras destinadas à reação de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona.** 1997, 39f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. In humans. **Microbes and Infection**, v.2 p1265-1276, 2000.
- RAGOZO, ALESSANDRA MA et al. Ocorrência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.
- ROJO-MONTEJO, S.R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; LÓPEZ-PÉREZ, I.; RISCO-CASTILLO, V.; PRENAFETA, A.; LUIS MIGUEL ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 62, 2013.
- RYAN, Eoin Gerard et al. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo seroprevalence in Beef/Suckler herds in the Republic of Ireland. **Irish veterinary journal**, v. 65, n. 1, p. 6, 2012.
- SÁNCHEZ, G. F.; MORALES, S. E.; MARTINEZ, M. J.; TRIGO, J. F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dog and cattle from Mexico. **Canadian Journal Veterinary Research**, Ottawa, v. 67, n. 2, p. 142-145, 2003.
- SARTOR, I. F. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 413-418, 2005.
- SCHREIER, Stefan et al. Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. **Expert review of clinical immunology**, v. 9, n. 3, p. 263-280, 2013.
- SILVA, F.J;. **Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão.** Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária Campus Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal, 2011.

SUN, W-W.; MENG, Q-F.; CONG, W.; SHAN, X-F.; WANG, CHUN-FENG. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Chlamydia abortus* and bovine viral diarrhoea virus in commercial dairy and beef cattle in eastern, northern and northeastern China. **Parasitology Research, New York**, v. 114, p. 4211–4218, 2015.

WILLIAM, V.; BERNARD, D.V. M. Leptospirosis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 9, n. 2, p. 435-443, 1995.

Yaeger, M. J, Holler, L. D. Bacterial causes of bovine infertility and abortion. Current Therapy in Large Animal. **Theriogenology**. 2a Edition; 2007.

UBERLÂNDIA. **Banco de dados integrados**. 2016. Disponível em: <http://www.uberlandia.mg.gov.br/uploads/cms_b_arquivos/16319.pdf>, Acesso em: 14 jun. 2018.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
- Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) -
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 08 - Campus Umuarama - Uberlândia-MG
CEP 38405-315; e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br
Telefone: 3225-8652



ANÁLISE FINAL Nº 199/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 027/18

Projeto Pesquisa: "Influência da vacinação nos índices reprodutivos em gado de corte"

Pesquisador Responsável: Anna Monteiro Correia Lima

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17



Universidade Federal de Uberlândia

- Comissão de Ética na Utilização de Animais -



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Influência da vacinação nos índices reprodutivos em gado de corte", protocolo nº 027/18, sob a responsabilidade de **Anna Monteiro Correia Lima** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 22 de junho de 2018.

(We certify that the project entitled "Influência da vacinação nos índices reprodutivos em gado de corte", protocol 027/18, under the responsibility of Anna Monteiro Correia Lima involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 22th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 10/12/2018 Término: 25/06/2019
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Bovino Nelore
Número de animais	73
Peso/Idade	300 kg a 400 kg
Sexo	Fêmea
Origem/Local	Fazenda Experimental Capim Branco/UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Fazenda Experimental Capim Branco/UFU

Uberlândia, 05 de dezembro de 2018

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU