

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CAUSAS DE ABORTO EM BOVINOS DIAGNOSTICADAS NO SETOR DE  
PATOLOGIA VETERINÁRIA DA UFRGS DE 2003 A 2011**

**Nadia Aline Bobbi Antoniassi**

Porto Alegre

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CAUSAS DE ABORTO EM BOVINOS DIAGNOSTICADAS NO SETOR DE  
PATOLOGIA VETERINÁRIA DA UFRGS DE 2003 A 2011**

**Autor:** Nadia Aline Bobbi Antoniassi

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientador:** Prof. Dr. David Driemeier

Porto Alegre

2012

#### CIP - Catalogação na Publicação

Antoniassi, Nadia Aline Bobbi  
Causas de Aborto em Bovinos diagnosticadas no  
Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de  
2003 a 2011 / Nadia Aline Bobbi Antoniassi. -- 2012.  
73 f.

Orientador: David Driemeier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2012.

1. Causa de aborto em bovinos. 2. Neospora  
caninum. 3. Brucella abortus. 4. Geotrichum  
candidum. 5. malformações congênitas. I. Driemeier,  
David, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NADIA ALINE BOBBI ANTONIASSI

CAUSAS DE ABORTO EM BOVINOS DIAGNOSTICADAS NO SETOR DE  
PATOLOGIA VETERINÁRIA DA UFRGS DE 2003 A 2011

Aprovada em 26/06/2012

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Dra. Ana Lucia Schild  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Aldo Gava  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz  
Membro da Comissão

## EPÍGRAFE

Deixe os olhos de uma menina encontrar na infância os seus sonhos, deixe esses, ocuparem o espaço do enorme vazio que a cerca, um vazio verde, onde a natureza apresentou sua beleza... que se refletia nos mesmos olhos de menina e que a fazia sonhar ainda mais com o mundo além daquele verde mundo

O silêncio tornou-se caos... a pureza da infância foi substituída pela aspereza do concreto. E as palavras codificadas vinham como tormenta em dias quentes... e sentiu a frieza do corte da faca, aprofundando na carne já sem vida. E assim deixou os sonhos da infância e surgiram outros... ainda mais distantes e mais frios.

E num suspiro de um Deus... um novo lugar! Novos rumos e pessoas... a faca e a carne tornaram uma coisa só, feito metades incompletas, mas perfeitamente unidas.

E dessa simétrica união surgiram outros sonhos. E num inesperado momento aquele mesmo Deus sussurrou... calor! E num giro fantástico entre os três sonhos, a vida pareceu uma criança que precisa respirar e começar a viver... não mais da matéria dos sonhos e sim da matéria vida.

Marcos de Almeida Souza

## DEDICATÓRIA

Dedico essa minha grande conquista a pessoas que tanto se dedicaram a me amar, cuidar, ensinar, apoiar, incentivar e nunca me deixar desistir de um sonho, apesar de tantos desafios.

Aos meus pais Paulo e Sueli, o motivo de tudo. É por vocês e para vocês tudo que sou e o que serei.

Aos meus irmãos Renata e Marcel e aos meus sobrinhos Luiz Henrique e João Paulo. Não há nada mais valioso que o amor e vocês me ensinaram isso.

Ao Gregory que sempre com muito amor esteve junto comigo nos melhores e nos piores momentos dessa jornada.

Aos meus eternos amigos que estiveram ao meu lado fazendo da minha caminhada mais alegre e valiosa. Fabi, Fran, Dani, João, Adri o apoio de vocês impediu muitas vezes que eu caísse, e quando cai, que eu tivesse coragem para levantar e tentar outra vez.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. David Driemeier pela orientação, pelo acolhimento e pelo seu exemplo de patologista e de pessoa.

Aos Prof. Dr. Luiz Gustavo Corbellini e Profa. Dra Caroline Pescador por iniciarem o trabalho com abortos, que resultou no tema da minha tese e por todo conhecimento que me transmitiram.

Aos meus colegas do Setor de Patologia Veterinária, Prof. Cláudio Cruz, Luciana Sonne, Djeison Raymundo, Eduardo Oliveira, Pedro Pedroso, Pedro Bezerra, Saulo Pavarini, Juliano Leal, Paulo Bandarra, Flademir e Angélica Wouters, Danilo Gomes, Fabiana Boabaid, Andre Dalto, Tatiane Watanabe, Luiz Oliveira, Gisele Boos, Marcele Brandinelli, Verônica Rolim, Suyene Souza, Barbara Krebs, Gabriel Correa, Felipe Souza, Ana Paula Bitencourt, Danielle Andrezza, Paula Almeida, pelo companheirismo, amizade e conhecimentos compartilhados. Em especial agradeço ao Gregory Juffo, Daniele Bassuino e Fabiana Wurster pela enorme ajuda com o trabalho dos fetos abortados e com a elaboração dos artigos.

Aos colegas veterinários que me auxiliaram enviando fetos para análise e pela confiança que depositaram no meu trabalho com o diagnóstico das causas de aborto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro, imprescindível para a realização da minha pós-graduação.

## RESUMO

A mortalidade fetal é uma causa importante de perdas reprodutivas em animais domésticos e tem impacto significativo na rentabilidade de um sistema de produção animal. No Brasil, poucas informações são disponíveis sobre as principais causas de aborto em bovinos. O presente estudo resultou em cinco artigos. O primeiro artigo descreve as principais causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período 2003-2011. Neste período um total de 490 fetos bovinos foi analisado. Causas específicas de aborto foram encontradas em 46,7 % dos casos. Infecções por protozoários, em especial *Neospora caninum* acometeram 33 % dos casos (162/490). Bactérias em 6,3 % (31/490), seguidas por fungos 0,8% (4/490) foram causas adicionais de abortos. Em dois fetos (0,4 %), coinfeções por dois agentes foram identificadas. Causas não infecciosas foram observadas em 3 % dos abortos e malformações congênitas a 2,6%. No segundo artigo estima-se a ocorrência de abortos por *Brucella abortus* em bovinos na região sul, caracterizando os achados macroscópicos, histopatológicos, bacteriológicos, imunohistoquímicos e de PCR desta enfermidade. No terceiro artigo relata-se a infecção por *Geotrichum candidum* em feto bovino abortado associado a lesões de pele e pulmonares. A ocorrência de malformações congênitas múltiplas em um feto bovino abortado é relatada no quarto artigo e casos de condrodisplasia tipo Dexter em fetos bovinos abortados são descritos no quinto.



## ***ABSTRACT***

The fetal mortality is an important cause of reproductive failure in domestic animals and has a significant impact on the profitability of a livestock production system. In Brazil, little information is available on the main cause of abortion in cattle. This study resulted in five articles. The first article describes the main causes of abortion in cattle diagnosed in the period January 2003 to december 2011. A total of 490 fetuses, from several Brazilian states, were evaluated. Specific causes of abortion were found in 46,7 % of cases. Protozoan abortions especially *Neospora caninum* were detected in 33 % (162/490) of the cases. Bacterial abortions corresponded to 6,3 % (31/490), followed by fungal 0,8 % (4/490). In two aborted fetuses (0,4 %), a co-infection with two agents could be identified. Noninfectious diseases could be associated with 3 % of the abortions and congenital malformations with 2,6%. In the second article estimated the incidence of abortion by *Brucella abortus* in cattle in the southern region, characterizing the macroscopic findings, histological, bacteriological, immunohistochemical and molecular aspects of this disease. The third article relates a *Geotrichum candidum* infection in aborted bovine fetus associated with skin and lung lesions. The occurrence of multiple congenital malformations in an aborted bovine fetus is reported in the fourth article and cases of Dexter chondrodysplasia type of aborted fetuses are described in the fifth.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. ARTIGO 1 “CAUSAS DE ABORTO EM BOVINOS DIAGNOSTICADAS NO SETOR DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DA UFRGS DE 2003 A 2011”</b> .....	<b>13</b>
<b>3. ARTIGO 2 “ABORTO BOVINO POR <i>BRUCELLA ABORTUS</i> NO SUL DO BRASIL”</b> .....	<b>31</b>
<b>4. ARTIGO 3 ”<i>BOVINE ABORTION DUE TO GEOTRICHUM CANDIDUM INFECTION</i>”</b> .....	<b>48</b>
<b>5. ARTIGO 4 “MALFORMAÇÕES MULTISSISTÊMICAS EM UM FETO BOVINO ABORTADO”</b> .....	<b>60</b>
<b>6. ARTIGO 5 “CONDRODISPLASIA TIPO DEXTER EM FETOS BOVINOS ABORTADOS”</b> .....	<b>67</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A mortalidade fetal é uma causa importante de perdas reprodutivas em animais domésticos e tem impacto significativo na rentabilidade de um sistema de produção animal. No Rio Grande do Sul, relatos de abortos em bovinos são frequentes e contribuem para os baixos índices de prenhez e nascimentos na região (Fernandes 1998).

A determinação das causas de aborto é fundamental para o controle sanitário dos rebanhos; entretanto, esse é um trabalho difícil e somente em cerca de 30% dos fetos bovinos abortados analisados, obtém-se um diagnóstico etiológico definitivo. A dificuldade do diagnóstico é decorrente dos múltiplos fatores que podem levar a ocorrência de perdas fetais, que incluem, além de muitos agentes infecciosos, causas genéticas, tóxicas, nutricionais e fatores relacionados ao animal, como a idade, paridade e histórico de aborto (Thurmond et al., 1990). Outro problema que dificulta o estabelecimento de um diagnóstico preciso está relacionado ao período de expulsão do feto após a sua morte, que pode ser de horas até dias, prejudicando a análise histopatológica devido à autólise dos tecidos e impedindo o isolamento de agentes etiológicos no momento do aborto. Somente em poucos casos, as membranas fetais, como a placenta, são encaminhadas para a análise, que normalmente são os primeiros a serem afetados e que apresentam maior contaminação. Além disso, fatores não infecciosos tais como agentes tóxicos e genéticos não são, facilmente, determinados em amostras remetidas ao laboratório.

A etiologia da mortalidade embrionária e fetal inclui causas infecciosas e não infecciosas. Embora as causas não infecciosas possam representar 70% ou mais dos casos, frequentemente, os exames são direcionados para a pesquisa de agentes infecciosos. As causas não infecciosas são multifatoriais, o que dificulta muito o diagnóstico, além disso, são comuns em situações endêmicas e difíceis de serem averiguadas. Estudos de diagnósticos em fetos bovinos revelam que grande parte dos casos com causa determinada é infecciosa (Anderson et al., 1990; Kirkbride 1992). Causas infecciosas são, talvez, superestimadas, mas, certamente, importantes em situações epidêmicas. Infecções podem causar mortalidade embrionária e alterar o

ambiente uterino, por inflamação do endométrio, por efeito direto no embrião, ou através de efeitos sistêmicos (febre e luteólise). Vírus, fungos, protozoários e diversas espécies de bactérias já foram identificados em casos de aborto bovino (Larson et al., 1996).

No Brasil, poucas informações são disponíveis sobre as causas de aborto em bovinos. Em um estudo realizado por Corbellini et al. (2006) em fetos bovinos abortados no sul do Brasil, o diagnóstico etiológico foi obtido em 51,5% dos 161 fetos analisados, 88% dos quais foram associados a agentes infecciosos, com destaque ao *Neospora caninum*. Esse protozoário do filo Apicomplexa tem sido considerado como a principal causa de aborto em muitos países. Estudos têm demonstrado uma variação de 12% a 77% na taxa de infecção por *N. caninum* (Dubey 2003). Na Califórnia, a prevalência do diagnóstico desse agente em fetos bovinos foi de 20% (Anderson et al. 2000) e, no Brasil, valores entre 13 e 39,1% foram encontrados por Corbellini et al. (2006) e Corbellini et al. (2002), respectivamente.

O Objetivo deste trabalho foi descrever as principais causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de 2003 à 2011; estimar a ocorrência de abortos por *Brucella abortus* em bovinos na região sul e caracterizar os achados macroscópicos, bacteriológicos, imuno-histoquímicos e de PCR; relatar um caso de infecção por *Geotrichum candidum* associado a lesões de pele e pulmonares em um feto bovino abortado; descrever um caso de malformações congênitas múltiplas em um feto bovino abortado e relatar dois casos de condrodissplasia tipo Dexter em fetos bovinos examinados no SPV-UFRGS.

## 2. ARTIGO 1

Neste item é apresentado o artigo “**Causas de aborto em bovinos diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011**” aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

## TRABALHO.....

### **Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011<sup>1</sup>**

Nadia A. B. Antoniassi<sup>2</sup>, Gregory D. Juffo<sup>2</sup>, Adriana S. Santos<sup>3</sup>, Caroline A. Pescador<sup>4</sup>, Luis G. Corbellini<sup>5</sup> e David Driemeier<sup>2</sup>.

**ABSTRACT.-** Antoniassi N.A.B., Juffo G.D., Santos A.S., Pescador C.A., Corbellini L.G. & Driemeier D. [**Causes of bovine abortion diagnosed in the Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul for the years of 2003-2011**] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br). Here, we describe the main causes of abortion in cattle diagnosed in the period January 2003 to December 2011. A total of 490 fetuses, from several Brazilian states, were evaluated. Specific causes of abortion were found in 46,7 % of cases. Protozoan abortions especially *Neospora caninum* were detected in 33 % (162/490) of the cases. Bacterial abortions corresponded to 6,3 % (31/490), followed by fungal 0,8 % (4/490). In two aborted fetuses (0,4 %), a co-infection with two agents could be identified. Noninfectious diseases could be associated with 3 % of the abortions and congenital malformations with 2,6%.

---

<sup>1</sup> recebido em .....

Aceito para publicação em .....

Parte da tese de doutorado do primeiro autor pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br).

<sup>3</sup> Doutoranda Setor de Patologia Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Campus Samambaia, Rodovia Goiânia/Nova Veneza (GO 462), km 0, CEP 74001-970, Goiânia/GO, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Médica Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Avenida Fernando Correa da Costa n<sup>o</sup> 2367, Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil.

<sup>5</sup> Laboratório de Epidemiologia (Epilab), Favet - UFRGS, Porto Alegre, RS.

INDEX TERMS: Fetuses, causes of bovine abortion, *Neospora caninum*.

**RESUMO:** Descreve-se as causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2011. Um total de 490 fetos bovinos foi analisado neste período. Causas específicas de aborto foram encontradas em 46,7 % dos casos. Infecções por protozoários, em especial *Neospora caninum* acometeram 33 % dos casos (162/490). Bactérias com 6,3 % (31/490), seguidas por fungos com 0,8 % (4/490) dos casos, foram causas adicionais de abortos. Em dois fetos (0,4 %), coinfeções por dois agentes foram identificadas. Causas não infecciosas foram observadas em 3 % dos abortos e Malformações congênitas em 2,6 %.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Feto, causas de aborto bovino, *Neospora caninum*.

## INTRODUÇÃO

A mortalidade fetal é causa importante de perdas reprodutivas em animais domésticos e tem impacto significativo na rentabilidade de sistemas de produção animal. No Rio Grande do Sul, relatos de abortos em bovinos são frequentes e contribuem para os baixos índices de prenhez e nascimentos verificados na região (Fernandes 1998). A determinação das causas do aborto é fundamental no controle sanitário dos rebanhos; entretanto, a tarefa é difícil e somente em 30 % dos fetos bovinos abortados analisados, obtém-se diagnóstico etiológico definitivo, em virtude das múltiplas causas envolvidas, já que muitos agentes, infecciosos ou não, podem estar envolvidos (Miller 1987, Kirkbride 1990, Kirkbride 1991, Jamaluddin et al. 1996).

No Brasil, poucas informações são disponíveis sobre causas de aborto em bovinos. Em estudo realizado por Corbellini et al. (2006a) em fetos bovinos abortados no sul do Brasil, o diagnóstico etiológico foi obtido em 51,5 % dos 161 fetos analisados, dos quais, 88 % foram associados a agentes infecciosos, com destaque para *Neospora caninum*. Esse trabalho descreve as principais causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de 2003 à 2011.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Aspectos gerais

Um estudo retrospectivo foi realizado nos arquivos de laudos de fetos bovinos examinados, desde janeiro de 2003 até dezembro de 2011. Os dados obtidos nesses laudos foram computados e analisados. Aborto bovino foi definido como a expulsão do feto vivo ou morto do útero, a partir de 42 dias até, aproximadamente, 260 dias de gestação, quando esse é incapaz de sobreviver em um ambiente extra-uterino (Hubbert et al. 1972). Cada aborto, mesmo quando múltiplo, foi considerado um caso.

Os fetos foram, geralmente, encaminhados inteiros, refrigerados, ou congelados e, por vezes, acompanhados de placenta e de uma ficha com dados da propriedade e do animal abortado. Em determinados casos, os fetos foram necropsiados pelo veterinário, a campo e somente fragmentos teciduais foram encaminhados para análise, tanto congelados como refrigerados.

### Necropsia e colheita de material

A necropsia fetal incluiu exame externo e a estimativa da idade fetal conforme medida do comprimento da nuca até a inserção da cauda (Barr et al. 1990), ou, quando disponível, através dos registros de cobertura. Fragmentos de encéfalo, pulmão, coração, fígado, rim, músculo esquelético, timo, baço, abomaso, pálpebra e placenta (ocasionalmente presente), foram coletados, fixados em formalina tamponada 10%, processadas rotineiramente para análise histopatológica e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (Prophet et al. 1992). Colorações especiais, como Gram, Prata metenamina de Grocott e ácido periódico de Schiff (PAS) foram realizadas, quando havia suspeita de infecção bacteriana ou micótica, com base nas alterações inflamatórias caracterizadas, principalmente, por broncopneumonia supurativa e placentite necrótica.

### Exames de imunofluorescência

Impressões de secções de rim foram testadas pela imunofluorescência direta (IFD) para *Leptospira* sp. com anticorpo comercial multivalente, na diluição de 1:20, segundo Miller et al. (1989), em todos os casos.

### Exames microbiológicos

Fragmentos de fígado, pulmão e conteúdo abomasal foram coletados para cultivo bacteriano. Em cultivo aeróbio inespecífico, utilizou-se agar sangue ovino (5%) e, para



isolamento de *Brucella* sp., meio base de agar sangue (Alton et al. 1988, Timoney et al. 1988) acrescido com 5% de sangue ovino e antimicrobianos. Para o cultivo de *Campylobacter* sp. foi utilizado meio BHI (brain heart infusion), conforme Plastring et al. (1961), em todos os fetos, até 2009. Em casos onde havia suspeita de envolvimento fúngico pulmão, fígado e pele foram encaminhados para o cultivo micológico, em agar *sabouraud*. A placenta foi encaminhada para exame bacteriológico e/ou micológico em casos onde havia lesões macroscópicas sugestivas de infecção bacteriana ou fúngica.

### **Exames imuno-histoquímicos**

Todos os fetos analisados foram submetidos ao exame imuno-histoquímico (IHQ) para vírus da diarréia viral bovina (BVDV), independentemente, da presença de lesões macro e microscópicas. A IHQ para *Neospora caninum* foi realizada em fetos com lesões sugestivas tais como encefalite, miosite e/ou miocardite não supurativas. Já a IHQ para *Toxoplasma gondii* foi realizada em casos com suspeita clínica e lesões sugestivas como áreas de necrose encefálica associada à inflamação mononuclear.

IHQ para BVDV foi realizada, em fragmentos de timo e encéfalo, com anticorpo monoclonal anti-BVDV (15C5 Syracuse, USA), na diluição de 1:500, em PBS. A recuperação antigênica foi feita com protease XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Mo) a 0,05%, por 15 minutos a 37° C. O anticorpo primário foi aplicado durante 50 minutos à temperatura de 37°C, seguido do anticorpo secundário biotinalado e solução streptavidina conjugada a uma molécula de fosfatase alcalina (LSAB + System AP, Dako Cytomation), por aproximadamente, 20 minutos cada, à temperatura ambiente. Como cromógeno, utilizou-se o *Permanent Red* (Permanent Red/ code 0695, Dako). Controles positivos foram inseridos, simultaneamente, com as lâminas testadas (Schmitz 2006).

IHQ para *N. caninum* e *T. gondii* foram realizadas em fragmentos de encéfalo, pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB Dako). Após desparafinadas em xilol, as lâminas foram hidratadas em concentrações decrescentes de álcool, lavadas em água destilada, cobertas por solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica incluiu 10 minutos de digestão previa com tripsina 1% a 37° C e irradiação em micro-ondas, de uso doméstico, por dois minutos, em potência máxima. Durante essa etapa, as lâminas ficaram imersas em tampão citrato (pH 6,0). Os anticorpos primários policlonais anti-*N.*

*caninum* e anti-*T. gondii* foram utilizados na diluição de 1:1000 em tampão fosfato (PBS), durante 45 minutos e a 37° C. Posteriormente, aplicou-se o anticorpo secundário biotinalado e solução de avidina conjugada com a peroxidase por 30 minutos cada, à temperatura ambiente. A revelação da marcação foi obtida através da utilização do cromógeno 3,3'- diaminobenzidina (DAB – Dako, Carpinteria, CA), por 5 – 10 minutos. Em cada teste, foram incluídos cortes controles positivos.

Em todos os testes imuno-histoquímicos, para o bloqueio das marcações inespecíficas (*background*), utilizou-se leite desnatado Molico® a 5%, durante 15 minutos, à temperatura de ambiente. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris, por 1 minuto.

## RESULTADOS

Entre janeiro de 2003 e dezembro de 2011, 490 fetos bovinos foram analisados no SPV-UFRGS. Esses fetos foram provenientes do Rio Grande do Sul (275), Goiás (17), Paraná (12), Santa Catarina e Minas Gerais (9 cada), Mato Grosso do Sul (7), São Paulo (5), Alagoas, Mato Grosso e Rio de Janeiro (1 cada). Em 153 casos, a procedência não foi informada.

A idade gestacional foi determinada em 61 % dos casos (319/490), dos quais 12,5 % (40/319) correspondiam ao primeiro trimestre de gestação, 62 % (198/319) ao segundo e 25,4 % (81/319) ao terceiro. Entre os fetos abortados, 27,7 % eram fêmeas e 23,1 %, machos. Em 49,2 % (241/490) dos casos não foi possível estabelecer, ou não foi informado o sexo fetal. Os fetos distribuíram-se em raças leiteiras 43 % (211/490), de corte 6,7 % (33/490) e mistas 1 % (5/490). Em 49,2 % (241/490) dos casos, não havia informação da raça.

Dos 490 casos analisados, 53,67 % (263/490 casos) não tiveram diagnóstico estabelecido, sendo que, em 223 casos, não havia lesões histológicas. Ainda, em 40 casos, as alterações histológicas observadas foram, predominantemente, supurativas, mas não conclusivas. Nesse grupo de fetos, os exames complementares também não foram suficientes para estabelecer o diagnóstico.

Em 227 casos (46,32 % de 490) com diagnóstico conclusivo, classificou-se a sua etiologia em aborto infeccioso, não infeccioso e outros. As causas infecciosas compreenderam 87,66 % dos casos (199/227), os quais foram divididos em abortos por

protozoários 71,36 % (162/227), bactérias 13,65 % (31/227), fungos 2,64 % (6/227), e associações entre esses 0,88 % (2/227).

Entre os protozoários, *Neospora caninum* foi mais frequentemente relacionados com os abortos e respondeu por 32,6 % (160/490) dos casos. O diagnóstico foi fundamentado pela observação de lesões compatíveis como encefalite, miosite e miocardite não supurativas, em associação com IHQ positiva, obtida em 17,5 % dos casos. Um caso de infecção materna por *Babesia bovis* foi associada com aborto. O diagnóstico foi baseado no histórico clínico e esfregaço sanguíneo da fêmea. O feto não apresentou nenhuma alteração macro ou microscópica. Um caso de aborto por infecção por *Toxoplasma gondii* foi associado com extensas áreas de necrose, microgliose e infiltrado linfoplasmocitário, além da presença de cistos e taquizoítos marcados na IHQ anti-*T. gondii*.

Os agentes bacterianos mais frequentes foram *Brucella abortus* e *Escherichia coli* 1,43 % cada (7/490), *Staphylococcus aureus* 1,22 % (6/490), *Streptococcus* sp. 0,82 % (4/490), *Leptospira* sp. 0,61 % (3/490), *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* sp., *Mannheimia* sp. e *Proteus* sp. com 0,2 % (1/490), cada.

O diagnóstico de aborto por *Leptospira* sp. incluiu a detecção de icterícia e hemorragia, além de vasculite placentária severa e nefrite intersticial mononuclear em dois casos e a confirmação por imunofluorescência direta em impressões de secções de rim. A infecção por *Brucella* sp. foi fundamentada em achados macro e microscópicos associados ao isolamento do agente em tecidos fetais. As principais alterações macroscópicas observadas foram caracterizadas por secreção mucopurulenta na cavidade nasal, traquéia e brônquios; deposição de fibrina na pleura e pericárdio; pulmões não colabados com pontos brancos no parênquima e áreas avermelhadas nos lobos apicais. Em três placentas, havia áreas avermelhadas nas regiões intercotiledonárias, áreas circulares bem delimitadas de coloração amarelo-esbranquiçadas na superfície dos cotilédones e parede espessada. Microscopicamente, broncopneumonia necro-supurativa, pneumonia intersticial e placentite necro-supurativa com áreas de vasculite, mineralização e trombose, foram as lesões mais frequentes em fetos afetados por *B. abortus*. Para as demais bactérias, o diagnóstico se baseou na observação de lesões histológicas supurativas com crescimento puro ou quantidade abundante do agente bacteriano ao exame microbiológico. Macroscopicamente, pontos

esbranquiçados, entre 0,5 e 1,0 mm de diâmetro, estiveram presentes na pele na maioria dos casos. Histologicamente, dermatite e pneumonia supurativas associadas com colônias bacterianas foram achados frequentes.

Dos quatro casos de aborto micótico, dois foram associados à *Aspergillus fumigatus*, um à *Geotrichum candidum* e um à Zigomicetos. As alterações macroscópicas estiveram presentes, principalmente, na pele e caracterizaram-se por lesões branco-acinzentadas circulares distribuídas, especialmente, na cabeça e nuca e, quando presentes na placenta eram associadas com espessamento de cotilédones. Histologicamente observaram-se dermatite e placentite supurativas com estruturas de hifas intralesionais. Para o diagnóstico de aborto micótico, foram consideradas as avaliações macro e microscópica, inclusive com aplicação de colorações especiais como prata metenamina de Grocott e ácido periódico de Schiff (PAS), além do cultivo, principalmente, de placenta e conteúdo abomasal.

Infecção por BVDV foi observadas em um caso, em co-infecção com *Neospora caninum*, e o diagnóstico viral foi baseado na IHQ anti-BVDV. Associação entre agentes foi observada ainda entre *N. caninum* e *E. coli* em um caso. Esse tipo de diagnóstico foi estabelecido quando o feto apresentou lesões compatíveis e resultado positivo em exames complementares para dois agentes distintos.

Causas não infecciosas foram identificadas em 6,6 % dos casos (15/227), dos quais seis distocias e três casos de trauma/estresse, de gestações gemelares e de rupturas hepáticas. O diagnóstico das causas não infecciosas fundamentou-se nos resultados negativos nos exames realizados, na ausência de alterações macro e microscópicas sugestivas de agentes infecciosos e nos dados clínicos como estresse materno anterior ao aborto e gestação gemelar. As anomalias congênitas foram classificadas em uma categoria a parte, uma vez que podem ser causadas tanto por agentes infecciosos, quanto por não infecciosos e estiveram presentes em 5,7 % (13/227) com observação de alterações como osteopetrose, *Amorpus globosus*, diprosopo, palatosquise, artrogripose, hipotricose, bragnatismo com agenesia renal, espinha bífida e condrodíplasia, além de anomalias múltiplas cardíacas, pulmonares e articulares em um feto. Dados sobre anomalias congênitas diagnosticadas no SPV–UFRGS foram parcialmente publicadas por Pavarini et al. (2008).

O Quadro 1 apresenta as principais causas de aborto bovino estudadas. A figura 1 apresenta a frequência de casos de aborto com diagnóstico conclusivo e com causas infecciosas e não infecciosas.

## DISCUSSÃO

Em 46,7 % dos abortos estudados foi possível relacionar um agente etiológico, diferente dos 51,5 % observados por Corbellini et al. (2006a). Na maioria dos estudos realizados, somente em 30 a 40 % dos fetos, obtém-se diagnóstico etiológico definitivo. Isso, em parte, ocorre devido à multiplicidade de causas envolvidas (Kirkbride 1990), mas, especialmente, decorre das dificuldades inerentes à identificação e ao isolamento dos agentes, o que, em determinados casos, é ainda mais prejudicado pela autólise fetal (Fernandes 1998).

O diagnóstico de *Neospora caninum* em 32,6 % dos casos evidenciou a importância dessa causa de aborto nos rebanhos bovinos leiteiros brasileiros. Estudos têm demonstrado variações entre 12 e 77 % na taxa de infecção por *N. caninum* (Dubey 2003). Entretanto, 20 % dos abortos bovinos na Califórnia (Anderson et al. 2000) e 13 a 39,1 % dos abortos bovinos no Brasil (Corbellini et al. 2006a e 2002), respectivamente, têm sido, consistentemente, ligados ao protozoário. O diagnóstico da infecção por *N. caninum* foi realizado pela associação de achados característicos da infecção. Segundo, Anderson et al. (2000) e Dubey (2003), o diagnóstico de *N. caninum* pode ser fundamentado na detecção histopatológica de encefalite multifocal, em combinação com miocardite e miosite, pois tais lesões são, fortemente, sugestivas da infecção. No entanto, a possibilidade da infecção por *N. caninum* em fetos nos quais as lesões não são encontradas no cérebro necessitam ser consideradas (Corbellini et al. 2006a, Pescador et al. 2007a).

A infecção por *N. caninum* foi confirmada através da IHQ em 17,5 %. Corbellini et al. (2000) descreveram positividade em 10 % dos 30 fetos testados em IHQ anti-*N. caninum*. Cabral et al. (2009) observaram 8,6 % de positivos na IHQ em 75 fetos com lesões compatíveis com o agente. A IHQ é bastante específica; entretanto, pouco sensível (Van Maanen et al. 2004). A ausência de taquizoítos ou cistos de *N. caninum* em tecidos com lesões características do protozoário não descarta a possibilidade do aborto ter sido causado por esse agente, pois sua distribuição pode ser esporádica e

esparsa nos tecidos (Thilsted & Dubey 1989). Além disso, outras causas como presença de reações inflamatórias e autólise podem afetar a morfologia e antigenicidade do protozoário, além de influenciar na marcação (Hattel et al. 1998).

Infecção materna por *Babesia* sp. foi associada a um aborto. A expulsão fetal ocorre, principalmente, devido à hipertermia relacionada a infecção materna

*Toxoplasma Gondii* é um protozoário, frequentemente, associado com abortos em ovinos e caprinos; entretanto, há poucos relatos do aborto bovino por esse agente (Gottstein et al. 1998, Sager et al. 2001, Moré et al. 2008). No presente estudo, as lesões observadas nesse feto restringiam-se ao encéfalo. Em caprinos e ovinos infectados por *T. gondii*, as lesões microscópicas são, particularmente, observadas no cérebro, fígado e pulmão (Pescador et al. 2007b, Caldeira et al. 2011). Encefalite não supurativa e gliose multifocal têm sido, frequentemente, descritas nessa infecção (Pescador et al. 2007b, Caldeira et al. 2011), como também foi confirmado nesse estudo.

Poucos dados a respeito da prevalência de *Brucella abortus* em fetos abortados são disponíveis e há grande variação nos testes utilizados nos estudos. Campero et al. (2003) detectaram a infecção por *B. abortus* em 7,9 % de 354 fetos bovinos analisados na Argentina. Cortez et al. (2006), no Brasil, analisaram 124 amostras por PCR e detectaram DNA de *Brucella* spp. em 13,7 % delas. Em 70 (5,56 %) de 1259 fetos bovinos abortados submetidos à bacteriologia, isolou-se *B. abortus* (Genovez et al. 2006).

Neste estudo, *Leptospira* sp. foi identificada por IFD em 0,61 % dos abortos. Isto difere dos dados de Cortez et al. (2006) que detectaram ácidos nucleicos de *Leptospira* sp. por PCR em 3,6 % de amostras de 124 fetos analisados e provenientes de estados brasileiros. Já Langoni et al. (1999) isolaram *Leptospira* sp. em 12,5 % dos 120 fetos analisados, em São Paulo. A menor taxa de detecção de *Leptospira* sp. observada, em comparação com os demais estudos, pode ser devida ao tipo de teste confirmatório utilizado, que, apesar de apresentar resultados satisfatórios para a detecção do agente, pode apresentar resultados falso negativos influenciados pela fragilidade do agente frente a processos como autólise e congelamento, por exemplo. A ausência de lesões em fetos abortados não deve excluir o diagnóstico de *Leptospira* sp, pois sorovar hardjo é bem adaptado a bovinos e pode não causar lesões significativas na espécie (Thiermann 1982).

Diversas espécies de bactérias oportunistas podem causar septicemia e aborto esporádicos em animais de produção (Corbellini et al. 2006b). *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces pyogenes*, *Nocardia* sp., *Mannheimia* sp. e *Proteus* sp. foram isolados e associados com abortos bovinos nesse estudo.

Infecções micóticas podem causar placentite necrosante e aborto em diversas espécies de animais (Ainsworth & Austwick 1973, Zook & Migaki 1985). Perdas econômicas significativas podem ser decorrentes dessas infecções, inclusive prevalência de aborto micótico da ordem de 24,9 % já foi relatada (Ainsworth & Austwick 1973). O *Aspergillus fumigatus*, diagnosticado em dois casos, é a principal espécie encontrada em casos de aborto micótico em bovinos.

Vírus como BVDV e BHV-1, frequentemente associados a abortos bovinos não tiveram grande importância nos casos analisados. Apesar da realização de testes imunohistoquímicos para detecção de BVDV em todos os fetos analisados, somente um caso foi identificado, e este em associação com *N. caninum*. O diagnóstico de infecção por BHV-1 em fetos bovinos é realizado pela observação de lesões histopatológicas caracterizadas por necrose hepática e posterior realização do teste de IHQ, entretanto no período analisado tais lesões não foram observadas em nenhum caso.

Diferentes associações entre agentes foram observadas neste trabalho. O envolvimento de múltiplos agentes em abortos bovinos tem sido relatado (Caldow 1998). Infecção por *N. caninum* tem sido associada a diferentes agentes, tais como BVDV e BHV-4 (Dubey et al. 1990; Nietfeld et al. 1992). Torna-se difícil indicar qual infecção é a principal responsável pelo aborto e se a sinergia entre os agentes concorrentes pode ser mais prejudicial para a sobrevivência fetal (Corbellini et al. 2006a).

Estudos etiológicos em fetos bovinos abortados revelam que a maioria dos casos com causa determinada se deve a agentes infecciosos (Anderson et al. 1990, Kirkbride 1992). Entretanto, acredita-se que as causas não infecciosas sejam subestimadas, pois há grande dificuldade no diagnóstico destas, já que não apresentam lesões histológicas e há, em sua maioria, necessidade de estudo epidemiológico detalhado do animal e da propriedade. A incidência de distocia em bovinos varia de 3 a 25% e ocorre, especialmente, em novilhas de primeira cria de raças de maior porte (Smith 2006). A

falha da dilatação cervical é a causa mais comum de distocia bovina (Noakes 1992). Os fetos, geralmente, morrem devido à asfixia e as lesões observadas são áreas de edema sublingual e trombos de fibrina em vasos cerebrais. Três casos foram associados ao histórico de trauma ou stress da mãe. Nenhum desses fetos apresentou lesões macro e microscópicas, além de apresentarem resultados negativos para todos os exames complementares realizados. Em três fetos, ruptura hepática e hemoperitônio foram observados. Acredita-se que esses fetos possam ter sofrido trauma intrauterino, ou no momento da expulsão uterina. Três casos foram associados à gestação gemelar de fetos de sexos distintos. Usualmente, a gemelaridade em bovinos é associada com distocia, a qual não raramente, leva à morte de um, ou ambos os fetos.

Os resultados do presente estudo demonstraram as principais causas de perdas fetais em bovinos. Foi reforçada a importância de *N. caninum* como causa de aborto nessa espécie. Essa investigação incluiu o registro de infecções por agentes não associados, previamente, com abortos em bovinos, o que evidencia a necessidade da continuidade dos estudos. Enfatiza-se a importância de estudos epidemiológicos desses casos distintos, tanto para incremento na eficiência diagnóstica dessas causas de aborto, em especial, das não infecciosas ainda pouco elucidadas.

## REFERENCIAS

- Ainsworth G.C. & Austwick P.K.C. 1973. Mycotic abortion, p 74-80. In: Fungal Diseases of Animals. 2nd ed. Commonwealth Agriculture Bureaux, Farnham Royal, Slough, UK.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, p.169-174.
- Anderson M.L., Andrianarivo A.G. & Conrad P.A. 2000. Neosporosis in cattle. Animal Reprod. Sci. 60-61:417-431.
- Anderson M.L., Blanchard P.C., Barr B.C. & Hoffman R.L. 1990. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. J. Vet. Diagn. Invest. 2:283-287.



- Barr C.B., Anderson M.L., Blanchard P.C., Daft B.M., Kinde H. & Conrad P.A. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* 27: 354-361.
- Cabral A.D., Camargo C.N., Galleti N.T.C., Okuda L.H., Pituco E.M. & Del Fava C. 2009. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 18(4):14-19.
- Caldeira F.H.B, Ubiali D.G., Godoy I., Dutra V., Aguiar D.M., Melo A.L.T., Riet-Correa F., Colodel E.M. & Pescador C.A. 2011. Outbreak of caprine abortion by *Toxoplasma gondii* in Midwest Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11):933-937.
- Caldow G.L. 1998. Bovine abortion outbreak associated with *Neospora* and other infectious agents. *Vet. Rec.* 142:118–119.
- Campero C.M., Moore D.P., Odeon A.C., Cipolla A.L. & Odriozola E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.* 27:259-269.
- Corbellini L.G., Driemeier D., Cruz C. & Dias M.M. 2000. Aborto Bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. *Cienc. Rural.* 30(50): 863-868.
- Corbellini L.G., Driemeier D., Cruz C.E.F., Gondim L.F.P. & Wald V. 2002. *Neospora caninum* as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 103:195-202.
- Corbellini L.G., Pescador C.A., Frantz F., Wunder E., Steffen D.J., Smith D.R. & Driemeier D. 2006a. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in southern Brazil. *Vet. J.* 172(1):114-120.
- Corbellini L.G., Pescador C.A., Frantz F.J., Cardoso M. & Driemeier D. 2006b. *Staphylococcus* spp. abortion: skin lesions caused by *Staphylococcus aureus* infection in an aborted bovine-fetus. *Vet. Res. Commun.* 30:717-721.
- Cortez A., Castro A.M.G., Heinemann M.B., Soares R.C., Leite R.C., Scarcelli E., Genovez M.E., Alfieri A.A. & Richtzenhain L.J. 2006. Detecção de ácidos nucleicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarréia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(6): 1226-1228.
- Dubey J.P. 2003. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89:542-556

- Dubey J.P., Miller S., Lindsay D.S. & Topper L.J. 1990. *Neospora caninum* associated myocarditis na encephalitis in na aborted calf. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:66-69.
- Fernandes C.G. 1998. Doenças da reprodução. In: Riet-correa F., Schild A.L. & Mendez M.D.C. (Eds.). *Doença de Ruminantes e Eqüinos*. Ed. Universitária/UFPEL, Pelotas. 651p.
- Genovez M.E., Scarcelli E., Cardoso M.V., Piatti R.M., Campos F.R., Piatti R.M., Teixeira S.R., Castro V., Gotti T.B. & Batista C.S.A. 2006. Main bacterial agents as cause of abortions in bovines in Brazil. In: XXIV World Buiatric Congress, Nice.
- Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Busato A., Stärk K.D. & Müller N. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28(4):679-91.
- Hattel A.L., Castro M.D., Gummo J.D., Weinstock D., Reed J.A. & Dubey J.P. 1998. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet. Parasitol.* 74:307-313.
- Hubbert W.T., Dennis S.M. & Adams C.J. W. M., Bierschwal, C. J., Biggers, J. D., Carrol, E. J., Dunne H W., Hutton N. E., Kendrick J.W., Kenney R.M., Kirkham W.W., Leipold H.W., Lingard D.R., McDonald L.E., Miner M.L., Mossman, H. W., Murdick, P. W., Oberst, F. H., Priestler, W. A., Range, J. C., Simon, J., Smith, R. E., Swift, B. L., Wagner, W. C., Williams, E. I. & Zemjanis, R. 1972. Recommendations for Standardizing Bovine Reproductive Terms. *Cornell Vet.* p.217- 237.
- Jamaluddin A.A, Case J.T., Hird D.W., Blanchard P.C., Peauroi J.R. & Anderson M.L. 1996. Dairy cattle abortion in California: evaluation of diagnostic laboratory data. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:210-218.
- Kirkbride C.A. 1990. *Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion*. 3.ed. Iowa State University Press. 260p.
- Kirkbride C.A. 1991. Causes and prevention of bovine abortion. *Bov. Proceed.* 23:75-80
- Kirkbride C.A.1992. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(2):175-180.
- Langoni H., Souza L.C., Silva A.V., Luvizotto M.C., Paes A.C. & Lucheis S.B. 1999. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 40:271-275.

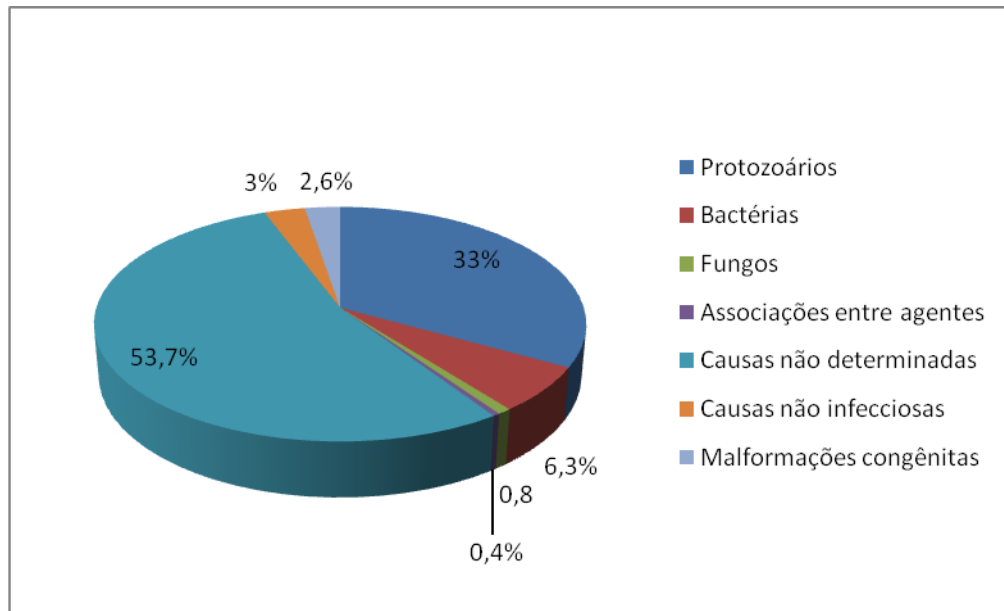
- Miller D.A., Wilson M.A. & Kirkbride C.A. 1989. Evaluation of multivalent leptospira fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1(2): 146-149.
- Miller R.B. 1987. Diagnosing the Cause of Bovine Abortion. *Bov. Pract.* 22:98-101.
- Moré G., Basso W., Bacigalupe D., Venturini M.C. & Venturini L. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum* and *toxoplasma gondii* infecctions in cattle. *Parasitol. Res.* 102(4):671-675.
- Nietfeld J.C., Dubey J.P., Anderson M.L., Libal M.C., Yaeger M.J. & Neiger R.D. 1992. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:223-226.
- Noakes D.E. 1992. Fertilidade e Obstetrícia nos Bovinos. Andrei Editora. São Paulo. p.43-49 e 72-101.
- Pavarini S.P., Sonne L., Antoniassi N.A.B., Santos A.S., Pescador C.A., Corbellini L.G. & Driemeier D. 2008. Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 28(3):149-154.
- Pescador C. A., Corbellini L.G., Oliveira E.C., Raymundo D.L. & Driemeier D. 2007a. Histopathological and immunohistochemistry aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *J. Vet, Parasit.* 150:159-163.
- Pescador C.A., Oliveira E.C., Pedroso P.M.O, Bandarra P.M., Okuda L.H., Corbellini L.G. & Driemeier D. 2007. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 27:167-171.
- Plastringe W.N., Koths M.E. & Williams L.F. 1961. Antibiotic mediums for the isolation of vibrios from bull semen *Am. J. Vet. Res.* 22:867-871.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B., Sobin L.H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology, Armed Forced Institute of Pathology. Washington, DC, 279p.
- Sager H., Fischer I., Furrer K., Strasser M., Waldvogel A., Boerlin P., Audigé L. & Gottstein B. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol.* 102:1-15.
- Schmitz M. 2006. Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 63p.

- Smith B.P. 2006. Medicina Interna de Grandes Animais. Manole: São Paulo. p.224-226.
- Thiermann A.B. 1982. Experimental leptospira infection in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. Am. J. Vet. Res. 43:780-784.
- Thilsted J.P. & Dubey J.P. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 1:205-209.
- Timoney J.F., Gillespie J.H., Scott F.W. & Barlough J.E. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th ed. Cornell University Press, Ithaca. 951p.
- Van Maanen C., Wouda W., Schares G., Von Blumröder D., Conraths F., Norton R., Williams D.J.L., Esteban-Redondo I., Ines E.A., Mattsson J.G., Björkman C., Fernández-García A., Ortega-Mora L.M., Müller N., Sager H. & Hemphill A. 2004. A interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. Vet. Parasitol. 126:351-364
- Zook B.C. & Migaki G. 1985. Aspergillosis in animals, p. 207-256. In: Al-Doory Y. & Waagner G.E. (ED) Aspergillosis. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois.

Quadro 1. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 2003 à 2011.

<b>Classificação</b>	<b>No. de casos</b>	<b>% do total</b>
<b>1. Causas determinadas</b>		
<b>1.1 Infeciosas</b>	<b>227</b>	<b>46,32</b>
Protozoários		
<i>Neospora caninum</i>	160	32,65
<i>Babesia bovis</i>	1	0,20
<i>Toxoplasma gondii</i>	1	0,20
Bactérias		
<i>Brucella</i> sp.	7	1,42
<i>Escherichia coli</i>	7	1,42
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	1,22
<i>Streptococcus</i> sp.	4	0,81
<i>Leptospira</i> sp.	3	0,61
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	0,20
<i>Mannhemia</i> sp.	1	0,20
<i>Nocardia</i> sp.	1	0,20
<i>Proteus</i> sp.	1	0,20
Fungos		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	0,40
<i>Geotrichum candidum</i>	1	0,20
Zigomicetos	1	0,20
Associações		
<i>N. caninum</i> + BVDV	1	0,20
<i>N. caninum</i> + <i>E. coli</i>	1	0,20
<b>1.2 Não infecciosos</b>	<b>15</b>	<b>3,06</b>
Distocia	6	1,22
Trauma/ stress	3	0,61
Gestação gemelar	3	0,61
Ruptura hepática	3	0,61
<b>1.3 Outros</b>		
Malformações congênicas	<b>13</b>	<b>2,65</b>
<b>2. Causas não determinadas</b>		
<b>2.1 Desconhecido</b>	223	45,51
<b>2.2 Lesões infecciosas</b>	40	8,16
<b>Total</b>	<b>490</b>	<b>100</b>

Figura 1. Frequência de causas não determinadas, não infecciosas, infecções por protozoários, bactérias, fungos e associações entre agentes diagnosticados em fetos bovinos abortados no período de 2003 à 2011



### 3. ARTIGO 2

Neste item é apresentado o artigo “**Aborto bovino por *Brucella abortus* no sul do Brasil**” submetido à publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

## Trabalho.....

### **Aborto bovino por *Brucella abortus* no sul do Brasil<sup>1</sup>**

Nadia A. B. Antoniassi<sup>2</sup>, Caroline A. Pescador<sup>3</sup>, Luís G. Corbellini<sup>2</sup>, Gregory D. Juffo<sup>2</sup>,  
Luciana Sonne<sup>2</sup>, Marcos J. P. Gomes<sup>2</sup>, Luciano Nakazato<sup>3</sup> e David Driemeier<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Antoniassi N.A. B., Pescador C.A., Corbellini L.G., Juffo G.D., Gomes M.J.P., Nakazato L. & Driemeier D. [**Bovine abortion due to *Brucella abortus* in southern Brazil.**] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)  
Brucellosis due to *Brucella abortus* infection is a contagious and zoonotic disease that causes abortions in cows, as well as joint and reproductive alterations in bulls. In a total of 469 aborted bovine fetuses analyzed in a period of nine years at SPV-UFRGS, nine cases (1.92 %) were due to *B. abortus* infection. The diagnosis was based on macroscopic, histological, microbiological, serological, immunohistochemical and molecular findings. Gestational age of fetuses ranged from 6 to 9 months. The main gross findings were characterized by discharge of pus in the nasal cavity, trachea and bronchi, and pleural and pericardial fibrin deposits, apart of non-collapsed lungs with white spots in the parenchyma and red areas in the apical lobes. In the intercotyledonary placentation from three placentas examined, there were reddened areas with interspersed well-defined yellow-white circular areas with thickened walls on the surface of the cotyledons. Microscopically, necro-suppurative bronchopneumonia,

---

<sup>1</sup> Recebido em ...

Aceito para publicação em ...

Parte da tese de doutorado do primeiro autor pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.  
\*Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

<sup>3</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Av. Fernando Corrêa da Costa s/n, Bairro Coxipó, Cuiabá, MT 78068-900, Brasil.



interstitial pneumonia and necro-suppurative placentitis with areas of vasculitis, mineralization, and thrombosis were the most common lesions. *Brucella abortus* was isolated from fetal tissues of seven of the nine cases. The immunohistochemistry test was positive in four cases and the PCR amplified genetic material of bacteria in three of them.

INDEX TERMS: Brucellosis, *Brucella abortus*, bovine abortion.

**RESUMO:** A brucelose, causada pela *Brucella abortus* em bovinos, é uma zoonose contagiosa e responsável por abortos no terço final da gestação, além de alterações articulares e reprodutivas em machos. Em um total de 469 fetos bovinos abortados analisados no período de nove anos no SPV-UFRGS, nove casos (1,92 %) foram associados com a infecção por *B. abortus*. O diagnóstico foi baseado nos achados macroscópicos, histológicos, microbiológicos, imuno-histoquímicos e moleculares. A idade gestacional dos fetos variou de 6 a 9 meses. As principais alterações macroscópicas observadas foram caracterizadas por secreção mucopurulenta na cavidade nasal, traqueia e brônquios e deposição de fibrina na pleura e pericárdio, além de pulmões não colabados com pontos brancos no parênquima e áreas avermelhadas nos lobos apicais. Em três placentas recebidas para exame, havia áreas avermelhadas nas regiões intercotiledonárias, áreas circulares bem delimitadas amarelo-esbranquiçadas na superfície dos cotilédones e parede espessada. Microscopicamente, broncopneumonia necro-suppurativa, pneumonia intersticial e placentite necro-suppurativa com áreas de vasculite, mineralização e trombose foram as lesões mais comuns. *B. abortus* foi isolada em tecidos fetais de sete dos nove casos. O teste de imuno-histoquímica foi positivo em quatro casos e o teste de PCR amplificou material genético da bactéria em três.

PALAVRAS CHAVE: Brucelose, *Brucella abortus*, aborto bovino.

## INTRODUÇÃO

A brucelose, uma zoonose contagiosa, geralmente, crônica, é caracterizada por afetar o sistema mononuclear fagocitário e causar abortos no terço final da gestação, além de

alterações articulares e reprodutivas em machos (Paulin 2003). Em bovinos, a infecção é causada pela *Brucella abortus*, bactéria gram-negativa, bastonete ou cocobastonete, não esporulada e não encapsulada, preferencialmente, intracelular (Paulin 2003). A doença possui grande importância sócio-econômica devido às implicações em saúde pública, além dos prejuízos econômicos associados com perdas reprodutivas e barreiras sanitárias (Brasil 2001, Paulin 2003). A ocorrência em rebanhos bovinos é relatada na maior parte do mundo, normalmente, sob baixa incidência que está, diretamente, relacionada ao sucesso de programas de controle e erradicação (Godfroid et al. 2004, Schlafer et al. 2007). Porém, em alguns países, onde a doença é endêmica e não controlada, a frequência pode variar entre 20 e 30 % (Godfroid et al. 2004). No Brasil, a brucelose apresenta uma situação endêmica estável e maior prevalência em regiões com maior densidade, como o sudeste e o centro-oeste do país (Brasil 2001).

A contaminação ambiental com membranas e fluidos fetais, além de descargas vaginais de fêmeas infectadas é a principal fonte de infecção para bovinos (Godfroid et al. 2004, Schlafer et al. 2007). Em fêmeas prenhes, o organismo chega ao endométrio gravídico e na placenta fetal por via hematogênica, durante a bacteremia, multiplicando-se no retículo endoplasmático rugoso de células trofoblásticas (Meador & Deyoe 1989), causando consequente placentite necrótica, responsável pela ocorrência de abortos (Paulin 2003, Godfroid et al. 2004, Schlafer et al. 2007). Lesões no feto podem não ser observadas, porém, quando presentes, caracterizam-se por broncopneumonia com áreas focais de necrose e pleurite com deposição de fibrina (Lopez et al. 1984, Schlafer et al. 2007). Meningite (Hong et al. 1991), vasculite (Schlafer et al. 2007), trombose em vasos linfáticos e sanguíneos (Lopez et al. 1984), além de formação de granulomas com células gigantes em linfonodos, fígado, baço e rim são observados (Schlafer et al. 2007).

O diagnóstico de aborto por *B. abortus* pode ser realizado através da observação de lesões macroscópicas e histológicas, isolamento bacteriano, principalmente, em conteúdo abomasal, além de testes como imunofluorescência, imuno-histoquímica (Schlafer et al. 2007) e reação em cadeia de polimerase (PCR) (Cortez et al. 2006).

O objetivo deste trabalho foi estimar a ocorrência de abortos por *Brucella abortus* em bovinos na região sul e caracterizar os achados macroscópicos, histopatológicos, bacteriológicos, imuno-histoquímicos e de PCR.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 469 fetos bovinos abortados foram encaminhados para diagnóstico ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), de setembro de 2001 à setembro de 2009, provenientes principalmente da região sul do Brasil. O aborto foi definido como interrupção da gestação entre 42 e 260 dias. Casos de nascimentos prematuros antes dos 260 dias de gestação também foram considerados abortos. Os fetos foram necropsiados e a idade foi estimada conforme o comprimento da nuca até a inserção da cauda (Barr et al. 1990). Fragmentos de cérebro, pulmão, fígado, rim, timo, coração, músculo esquelético, baço, pálpebra, abomaso e quando encaminhada placenta, foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para exame histopatológico e corados pela hematoxilina e eosina. Impressões de secções de rim foram testadas pela imunofluorescência direta para *Leptospira* spp. com anticorpo comercial multivalente, na diluição de 1:20 (Miller, Wilson & Kirkbride 1989). Amostras de fígado, pulmão e conteúdo do abomaso foram colhidas para exame bacteriológico aeróbico e para isolamento de *Brucella abortus*. O cultivo microaerófilo foi realizado em agar sangue acrescido com 7 % de sangue ovino incubado por 48h. Para o isolamento da *B. abortus* utilizou agar Brucella acrescido de antimicrobianos específicos. O período de incubação em meio sólido e condições ideais, leva de três a sete dias para a visualização das colônias, embora se recomende a incubação por no mínimo três semanas (CARTER, 1991). O gênero foi identificado por análise das características culturais, morfotintoriais e bioquímicas (BATHKE, et al., 1988; NIELSEN, 1995).

Imuno-histoquímica (IHQ) para *B. abortus* foi realizada em casos em que os fetos apresentaram lesões de pneumonia, meningite e placentite. O anticorpo policlonal foi produzido no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS a partir da inoculação do antígeno em coelhos. Os animais receberam uma dose (1 ml) de vacina viva (comercial) para *Brucella abortus* (B19) por via subcutânea e após 40 dias coletou-se o soro dos animais. O soro dos coelhos foi purificado em coluna de afinidade de IgG (GE Healthcare). A diluição do anticorpo primário foi de 1:500 com incubação durante 60 minutos à temperatura de 37°C. A Proteinase K (DAKO) foi utilizada por 10 minutos para a recuperação antigênica e as marcações inespecíficas foram reduzidas pela aplicação de leite Molico® desnatado a 5% por 15 minutos. Utilizou-se anticorpo

secundário biotinalado e solução da avidina conjugada com fosfatase (Kit LSAB + AP) (Dakocytomation) por aproximadamente 15 minutos cada, à temperatura ambiente. O cromógeno utilizado foi o Bio Red (Biopath), por 5 a 10 minutos, contra-corado com hematoxilina por 1 minuto. Fragmentos de timo e sistema nervoso central foram submetidos ao teste imuno-histoquímico com anticorpo monoclonal anti-BVDV (15C5 Syracuse, USA), na diluição de 1:500. A recuperação antigênica foi feita com protease XIV a 0,05%, após houve a aplicação de leite Molico® desnatado a 5%. O anticorpo primário foi aplicado durante 60 minutos à temperatura de 37°C, seguido do anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (Dako,USA). Vermelho permanente (permanent red/code 0695, Dako) foi o cromógeno utilizado.

A técnica de PCR para detecção da *B. abortus* foi realizada, em casos em que os fetos apresentaram lesões de pneumonia, meningite e placentite ou que houve isolamento de *B. abortus* em tecidos fetais, a partir de tecido parafinado com secções de 10mm, sendo cerca de 25 mg utilizada para a extração do DNA (Garmatz et al. 2004). A extração foi obtida empregando-se o par de "primers" 5' -GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC-3' e 5'- TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT TGC CAG-3' descritos por BAILY et al. (1992), que amplificam fragmentos de 498 pb. Através da eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada a análise do produto amplificado utilizando-se tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M TRISBorato e 1 mM de EDTA pH 8,0) e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta e analisado. O controle positivo da reação para brucelose foi uma suspensão da cultura da vacina B19. Como controle negativo da PCR utilizou-se a mistura da reação da PCR contendo água ultrapura, sem DNA. Anteriormente ao ciclo de temperaturas procedeu-se a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, ao final, a extensão a 72°C por 5 minutos. Foram empregados 30 ciclos, divididos em três fases: desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 5 segundos. Definiu-se que o aborto estaria associado a infecção por *B. abortus* em casos onde os fetos apresentassem lesões compatíveis com o agente e fossem positivos em algum dos testes utilizados para sua identificação, como isolamento, imuno-histoquímica e PCR.

## RESULTADOS

Entre setembro de 2001 a setembro de 2009 foram analisados 469 fetos bovinos abortados. Destes, nove (1,92%) foram relacionados à infecção por *Brucella abortus*, baseados nos achados macroscópicos, histológicos, microbiológicos, imuno-histoquímicos e moleculares. A idade gestacional dos fetos variou de 6 a 9 meses. Todos os fetos foram provenientes de nove propriedades da região Sul do Brasil e com histórico de outros casos de aborto no mesmo período. O histórico de vacinação prévia contra brucelose foi relatado em três propriedades, em uma a idade de vacinação dos animais foi duvidosa e em outras duas a vacinação não foi realizada. Em três propriedades a realização de vacinação não constava no histórico.

Lesões macroscópicas foram observadas em seis dos nove fetos (Fetos 2, 4, 5, 7, 8 e 9) e consistiram em secreção nasal mucopurulenta, também presente na luz da traqueia e brônquios no feto 8, deposição de fibrina na superfície pleural nos Fetos 7, 8 e 9, e no pericárdio do Feto 7 (fig. 1A). O pulmão apresentava pontos brancos no parênquima em todos os fetos (Fig. 1B), estava não colabado nos Fetos 1 e 3 e havia áreas avermelhadas nos lobos apicais do Feto 9. No fígado observaram-se áreas brancas intercaladas com áreas vermelhas no Feto 4 e estava aumentado de tamanho e com superfície avermelhada no Feto 5. Focos hemorrágicos foram observados na região sublingual do Feto 1, no rim do Feto 2, na pele e baço do Feto 4 e no músculo esquelético do membro posterior do Feto 9. Em apenas três Fetos (6, 7 e 9) a placenta foi encaminhada, e as alterações observadas foram áreas avermelhadas nas regiões intercotiledonárias nos Fetos 6 e 7, com áreas circulares bem delimitadas de coloração amarelo-esbranquiçadas no Feto 7 (Fig. 1C) e parede espessada com áreas difusas intensamente avermelhadas no Feto 9.

Alterações microscópicas estiveram presentes em 8 fetos (Fetos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9) e corresponderam à pleurite fibrino supurativa subaguda em graus variados (Fetos 1, 2, 3, 4, 5 e 7); pericardite fibrino supurativa difusa acentuada (Feto 7), broncopneumonia necro-supurativa subaguda (Fetos 4, 5 e 9) (Fig. 2A), broncopneumonia fibrino-supurativa (Feto 8), pneumonia intersticial mononuclear subaguda (Fetos 1 e 2). Vasculite mononuclear foram observadas no pulmão (Fetos 3, 4 e 5) e músculo esquelético (Feto 4). Hepatite mononuclear esteve presente nos Fetos 3 e 4 e associada a focos de necrose no Feto 9. Meningite mononuclear multifocal severa

associada à manguitos perivasculares multifocais no encéfalo foi visualizada no Feto 7 (Fig. 2B). No timo do Feto 8 havia trombos de fibrina e infiltrado inflamatório mononuclear difuso acentuado em trabéculas. No músculo esquelético do Feto 9 observava-se infiltrado inflamatório focal leve e áreas multifocais de degeneração hialina acentuada. No baço do Feto 3 havia infarto hemorrágico focal. Células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares no interior de vasos em órgãos como encéfalo, pulmão, músculos esqueléticos foram observadas em todos os fetos, com exceção dos Fetos 6 e 8. Áreas de congestão foram observadas nos rins, fígado, baço (Feto 8) e timo (Fetos 8 e 9). As lesões placentárias caracterizaram-se por placentite mononuclear subaguda associada à vasculite necro-supurativa (Fig. 2 C), áreas de mineralização, trombose e presença de estruturas compatíveis com bactérias no interior de células trofoblásticas (Feto 6), perivasculite supurativa leve (Feto 7) e placentite necro-supurativa moderada (Feto 9). As lesões macroscópicas e histológicas estão descritas detalhadamente no quadro 1.

O isolamento de *B. abortus* foi obtido em sete fetos (1, 2, 3, 4, 5, 7 e 9). Em cinco deles (Feto 1, 2, 3, 4, 5) o isolamento foi realizado através do conteúdo do abomaso, no Feto 7 foi realizado em fragmentos de pulmão e fígado e no Feto 9 foi obtido tanto em fragmento de pulmão como em conteúdo do abomaso. Marcação positiva na imuno-histoquímica para *B. abortus* foi observadas nos Fetos 2, 4, 7 e 8. Antígenos bacterianos foram detectados no interior de células inflamatórias mononucleares presentes em alvéolos pulmonares e debris celulares no Feto 2 e em focos necróticos nos pulmões dos Fetos 4, 7 e 8 (Fig. 3A). Foram observadas, também, marcações em células inflamatórias mononucleares e na luz de vasos sanguíneos na meninge (Feto 7) e placenta (Fetos 7 e 8) (Fig. 3B e 3C). A amplificação de material genético de *B. abortus* através da técnica de PCR foi detectada nos Fetos 5, 6 e 7. Nos fetos 5 e 7 a amplificação foi obtida em tecidos fetais, e no caso 6 esta foi obtida em tecido placentário. Todos os fetos foram negativos nos exames de imunofluorescência direta para *Leptospira* sp. e imuno-histoquímica para BVDV. Um resumo dos resultados obtidos nos exames microbiológicos, imuno-histoquímicos e de PCR são apresentadas no Quadro 2.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A frequência de infecção por *B. abortus* observada em fetos bovinos abortados analisados no SPV-UFRGS no período de 2001 a 2009 foi de 1,92%. Poucos dados a respeito da ocorrência deste agente através da detecção em fetos abortados são disponíveis e as variações entre os trabalhos está relacionada ao teste diagnóstico utilizado. Campero et al. (2003) na Argentina detectou infecção por *B. abortus* em 7,9% dos 354 fetos bovinos analisados. Cortez et al. (2006) no Brasil, utilizando a técnica de PCR em 124 amostras detectaram DNA de *Brucella* spp. em 13,7%. De 1259 fetos bovinos abortados submetidos a exame bacteriológico, em 70 casos (5,56%) foi isolados *B. abortus*, segundo Genovez et al. (2006).

A idade dos fetos avaliados variou de 6 a 9 meses e confirma a indução de abortos no final da gestação descritas em casos de infecção por *B. abortus* em bovinos (Godfroid et al. 2004, Schlafer et al. 2007). O histórico da ocorrência de outros abortos na propriedade, presentes em todos os casos reafirma que abortos por este agente não ocorrem de maneira isolada dentro de um rebanho e que os casos avaliados são provavelmente uma pequena parcela do real problema causado dentro de um sistema de produção.

O diagnóstico de aborto por *B. abortus* foi baseado nos achados macroscópicos e histológicos associados ao isolamento do agente em tecidos fetais, além de exames imuno-histoquímicos e de PCR. As lesões macroscópicas e histológicas encontradas nos fetos relatadas neste trabalho são compatíveis com as descritas para aborto por *B. abortus* (Lopez et al. 1984, Meador et al. 1986; Hong et al. 1991, Godfroid et al. 2004, Schlafer et al. 2007) e estão relacionadas a infecção fetal pelo agente através da aspiração de líquido amniótico contaminado (Lopez et al. 1984). Porém em alguns casos o aborto pode ocorrer pela placentite brucélica com ou sem aspiração de fluido amniótico e o feto pode não apresentar lesões (Lopez et al. 1984). Nestes casos, o envio da placenta torna-se indispensável para a obtenção do diagnóstico. No Feto 6 não foram observadas alterações fetais, entretanto na placenta, além de serem observadas lesões características de aborto bacteriano, material genético de *B. abortus* foi amplificado pela técnica de PCR comprovando o envolvimento deste agente.

O isolamento bacteriano não foi obtido nos tecidos fetais dos Fetos 6 e 8. Relata-se que o não isolamento da *B. abortus* em tecidos fetais até mesmo em casos em que há

lesões histológicas pode estar relacionado com deficiências na técnica de isolamento ou talvez com lesões relacionadas a outras bactérias que não a *B. abortus* (Lopez et al. 1984). Nestes dois casos o diagnóstico foi confirmado pelas técnicas de PCR em tecido placentário (Feto 6) e de IHQ em pulmão e placenta (Feto 8).

Alterações macroscópicas como edema subcutâneo e na musculatura esquelética e lesões sero-hemorrágicas em cavidades torácicas são descritas relacionadas à infecção por *B. abortus* por diversos autores (Hong, et al, 1991; Godfroid et al. 2004, Schlafer et al. 2007), porém estas alterações são observadas em praticamente todos os fetos analisados independente da causa do aborto, indicando estar relacionados a alterações pós morte. O não colapamento pulmonar observado nos Fetos 1 e 3 indicam respiração fetal estimulada pelo quadro de anóxia causada pela placentite necrótica. Os focos hemorrágicos observados em diferentes órgãos também foram relacionados à estase sanguínea fetal pela lesão placentária.

As células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares observadas no interior de vasos em diferentes tecidos são visualizadas com frequência em casos de aborto de origem infecciosa e foram observadas em praticamente todos os casos com exceção do Fetos 6 e 8. Estas células podem estar relacionadas com uma resposta celular do feto frente à infecção.

Marcação positiva na imuno-histoquímica foi observada nos Fetos 2, 4, 7 e 8 em órgãos como pulmão, meninges e placenta. A marcação de antígenos no citoplasma de células epiteliais coriônicas e células fagocíticas correspondem à localização intracelular da *Brucella* sp. em células do hospedeiros já descritas, porém é também observada livre no interior de vasos e em debris celulares de focos necróticos (Meador et al. 1986; Perez et al. 1998). O teste imuno-histoquímico possui grande especificidade para detecção de antígenos de *B. abortus*, porém a sensibilidade é baixa (Meador et al. 1986; Perez et al. 1998). A não marcação mesmo em casos em que houve isolamento bacteriano no tecido pode ser devido a baixa concentração de organismos no mesmo, já que existe uma quantidade mínima de unidades formadoras de colônia necessária para a identificação através da marcação com o cromógeno ou acúmulo de organismos no plano da secção do tecido analisado (Meador et al. 1986).

A amplificação de material genético de *B. abortus* foi realizada na placenta e/ou tecidos fetais em apenas três casos. Apesar da alta sensibilidade demonstrada por este



teste em condições laboratoriais, alguns fatores interferem nos resultados, como as condições do material e os métodos de armazenamento, por exemplo. A concentração do DNA bacteriano na amostra pode estar presente em níveis mais baixos que os detectados pelo teste, influenciando também em um resultado falso negativo. Desta forma, o PCR pode ser utilizado como uma ferramenta complementar de diagnóstico, porém quando diferentes abordagens diagnósticas são utilizadas em conjunto a taxa de sucesso é maior (Silva et al., 2009). O exame imuno-histoquímico e de PCR podem possibilitar o diagnóstico de *B. abortus* em casos onde amostras de tecidos de fetos bovinos não são disponíveis para cultivo, principalmente em tecidos placentários, onde a concentração de organismos é maior. Porém as alterações histológicas tanto no feto quanto na placenta associadas à detecção do agente (IHQ, isolamento ou PCR) são imprescindíveis para a realização do diagnóstico de aborto brucélico.

**Agradecimentos:** Às Professoras Doutoras Marisa Cardoso (UFRGS) e Marisa da Costa (UFRGS) pela realização de exames bacteriológicos; Aos Professores Doutores Aldo Gava (UDESC) e Cláudio Cruz (UFRGS) e a Doutora Ana Lucia Schild (UFPEL) pela revisão desse artigo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, p.169-174.
- Baily G.G., Krahn J.B., Drasar B.S. & Stoker N.G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95(4):271-275.
- Barr C.B., Anderson M.L., Blanchard P.C., Daft B.M., Kinde H. & Conrad P.A. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. Vet. Pathol. 27: 354-361.
- Brasil 2001. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle da Brucelose e da Tuberculose Animal. Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília.

- Campero C.M., Moore D.P., Odeon A.C., Cipolla A.L. & Odriozola E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.* 27: 259-269.
- Cortez A., Castro A.M.G., Heinemann M.B., Soares R.C., Leite R.C., Scarcelli E., Genovez M.E., Alfieri A.A. & Richtzenhain L.J. 2006. Detecção de ácidos nucléicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarréia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(6): 1226-1228.
- Diário Oficial da União de 29/01/2004 , Seção 1 , Página 3. Portaria DDA nº 11, de 26 de janeiro de 2004.
- Garmatz S.L., Irigoyen L.F., Rech R.R., Brown C.C., Zhang J. & Barros C.S.L. 2004. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: transmissão experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. *Pesq. Vet. Bras* 24(1): 93-106.
- Godfroid J., Bosman P.P., Herr S. & Bishop G.C. 2004. Bovine brucellosis, p.1510-1527. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C (Eds) . *Infectious Diseases of Livestock.* Vol 3. 2th ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Hong C.B., Donahue J.M., Giles R.C., Poonacha J.K.B., Tuttle P.A. & Cheville N.F. 1991. *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet. Pathol.* 28: 492-496.
- Lopez A., Hitos F., Perez A. & Navarro-Fierro R.R. 1984. Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. *Can. J. Comp. Med.* 48:275-277.
- Meador V.P., Deyoe B.L. 1989. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.* 26(6):513-515.
- Meador V.P., Tabatabai L.B., Hagemoser W.A. & Deyoe B.L. 1986. Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am. J. Vet. Res.* 47:2147-2150.
- Miller D.A., Wilson M.A. & Kirkbride C.A. 1989. Evaluation of multivalent leptospira fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1(2): 146-149.
- Paulin L.M. 2003. Brucelose. *Arq. Inst. Biol.* 70(2): 239-249.
- Perez J., Quezad M., Lopez J., Casquet O., Sierra M.A. & Mulas J.M. 1998. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from

aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 17-21.

Schlafer D.H. & Miller R.B. 2007. Female genital system, p. 429-564. In: Maxie M.G. Jubb, Kennedy, and Palmer's *Pathology of Domestic Animals*. Vol.3, 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Silva T.M.A., Oliveira R.I.G., Mol J.P.S., Xavier M.N., Paixão T.A., Cortez A., Heinemann M.B., Richtzenhain L.J., Lage A.P. & Santos R.L. 2009. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Cienc. Rural* 39: 2563-2570.

Quadro 1. Descrição das alterações macroscópicas e histológicas observadas em placentas e fetos bovinos abortados devido à infecção por *Brucella abortus* realizados no SPV-UFRGS

Feto	Alterações macroscópicas	Alterações histológicas
1	Pulmão: não colabado.	Pulmão: pleurite fibrino supurativa difusa acentuada; pneumonia intersticial mononuclear subaguda com presença de fibrina; células inflamatórias mononucleares no interior de vasos. SNC: células inflamatórias mononucleares no interior de vasos.
2	Pulmão: pontos brancos difusos na superfície e parênquima.	Pulmão: pleurite fibrino supurativa subaguda moderada; pneumonia intersticial mononuclear subaguda com fibrina; debris celulares no interior de brônquios. SNC: células inflamatórias mononucleares no interior de vasos.
3	Pulmão: não colabado. Cérebro: congestão moderada.	Pulmão: pleurite fibrino supurativo subaguda multifocal moderada, vasculite mononuclear multifocal acentuada; Fígado: hepatite mononuclear focal leve. SNC: células inflamatórias mononucleares no interior de vasos; congestão moderada. Baço: infarto hemorrágico focalmente extenso acentuado. Músculo esquelético: células inflamatórias polimorfonucleares no interior de vasos.
4	Pulmão: pontos brancos difusos na superfície e parênquima. Pele: áreas de equimoses e sulfusões. Fígado: áreas avermelhadas intercaladas com áreas esbranquiçadas. Baço: equimoses difusas.	Pulmão: pleurite fibrino supurativa subaguda multifocal leve; broncopneumonia necro-supurativa subaguda multifocal acentuada, vasculite mononuclear multifocal leve; células inflamatórias mononucleares no interior de vasos. Fígado: hepatite mononuclear focal moderada. Músculo esquelético: vasculite mononuclear multifocal leve. SNC: células inflamatórias mononucleares em vasos.
5	Pulmão: áreas esbranquiçadas de consistência firme intercaladas com áreas avermelhadas.	Pulmão: pleurite fibrino supurativa subaguda difusa moderada; broncopneumonia necro-supurativa difusa acentuada; vasculite mononuclear multifocal subaguda acentuada; grande quantidade de células inflamatórias mononucleares no interior de vasos. SNC: células inflamatórias mononucleares no interior de vasos.
6	Placenta: áreas avermelhadas na superfície intercotiledonária.	Placenta: placentite mononuclear subaguda difusa acentuada com áreas de calcificação e vasculite necro-supurativa multifocal moderada; presença de estruturas semelhantes a bactérias no interior de células. Trofoblásticas; trombos em vasos.
7	Pericárdio e pleura: acentuada deposição de fibrina. Placenta: áreas avermelhadas na superfície intercotiledonária com áreas circulares delimitadas de coloração amarelo-esbranquiçada.	Pulmão: pleurite fibrino supurativa difusa acentuada; presença de células inflamatórias no interior de vasos. SNC: manguitos perivasculares multifocais; meningite supurativa focalmente extensa moderada. Placenta: perivasculite supurativa leve. Coração: pericardite fibrino supurativa difusa acentuada.
8	Secreção nasal mucopurulenta. Traquéia: secreção mucopurulenta. Pleura: deposição de fibrina leve. Pulmão: pontos brancos distribuídos aleatoriamente por toda superfície e parênquima.	Pulmão: broncopneumonia fibrino supurativa acentuada e trombos de fibrina. Fígado: congestão difusa acentuada. Rim: congestão e hemorragia difusa acentuada. Timo: infiltrado inflamatório mononuclear difuso acentuado em trabéculas, trombos de fibrina e congestão difusa moderada. Baço: congestão difusa acentuada.
9	Pulmão: áreas vermelhas nos lobos apicais e pontos brancos na superfície e parênquima. Músculos esqueléticos do membro posterior direito: foco de hemorragia; Placenta: espessa e intensamente avermelhada.	Pulmão: broncopneumonia necro-supurativa difusa acentuada. Placenta: placentite necro-supurativa moderada. Fígado: hepatite multifocal moderada e foco de necrose. SNC: células polimorfonucleares no interior de vasos e congestão moderada. Músculo esquelético: infiltrado polimorfonuclear focal leve e áreas multifocais de degeneração hialina acentuada. Timo: congestão moderada.

Quadro 2. Resultados dos testes de cultivo microaerófilo, imuno-histoquímico e Reação em cadeia de Polimerase para *Brucella abortus* realizados em fetos bovinos abortados examinados no SPV-UFRGS

Caso	Isolamento				IHQ		PCR			
	Pulmão	Fígado	CA	SNC	Pulmão	Placenta	Pulmão	Placenta	Fígado, Rim, ME	SNC
1	N	N	P	NR	N	NR	N	NR	NR	NR
2	N	N	P	NR	P	NR	N	NR	NR	NR
3	N	N	P	NR	N	NR	N	NR	NR	NR
4	N	N	P	NR	P	NR	N	NR	NR	NR
5	N	N	P	NR	N	NR	P	NR	P	NR
6	N	N	N	NR	N	N	N	P	NR	NR
7	P	P	N	P	P	P	P	P	NR	P
8	N	N	N	NR	P	P	N	N	NR	NR
9	P	N	P	NR	N	N	N	N	NR	NR

IHQ imuno-histoquímica; PCR reação em cadeia de polimerase; CA conteúdo do abomaso; SNC sistema nervoso central; ME músculo esquelético; N negativo; P positivo; NR exame não realizado.

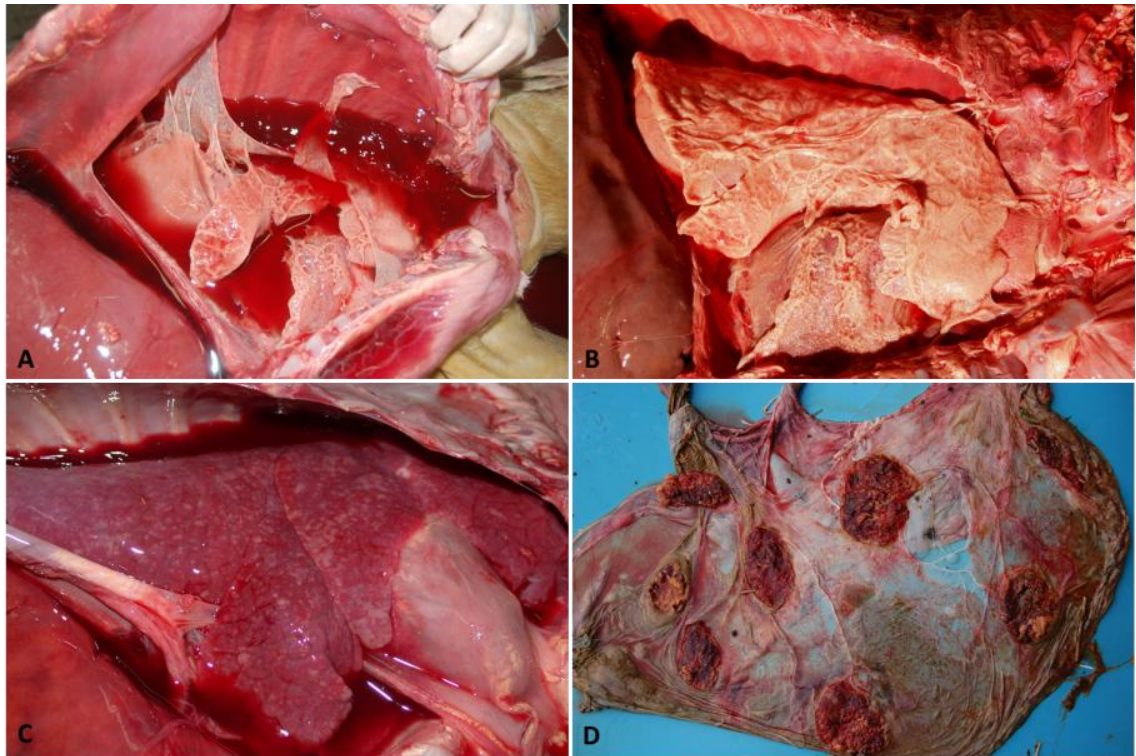


Figura 1. Fetos bovinos abortados infectados por *Brucella abortus*. A e B. intensa deposição de fibrina na superfície pleural e pericárdica. C. Pontos brancos no parênquima pulmonar variando de 0,1mm a 0,5 mm de diâmetro. D. Placenta com áreas avermelhadas nas regiões intercotiledonárias e com áreas circulares bem delimitadas de coloração amarelo-esbranquiçadas na superfície cotiledonária.

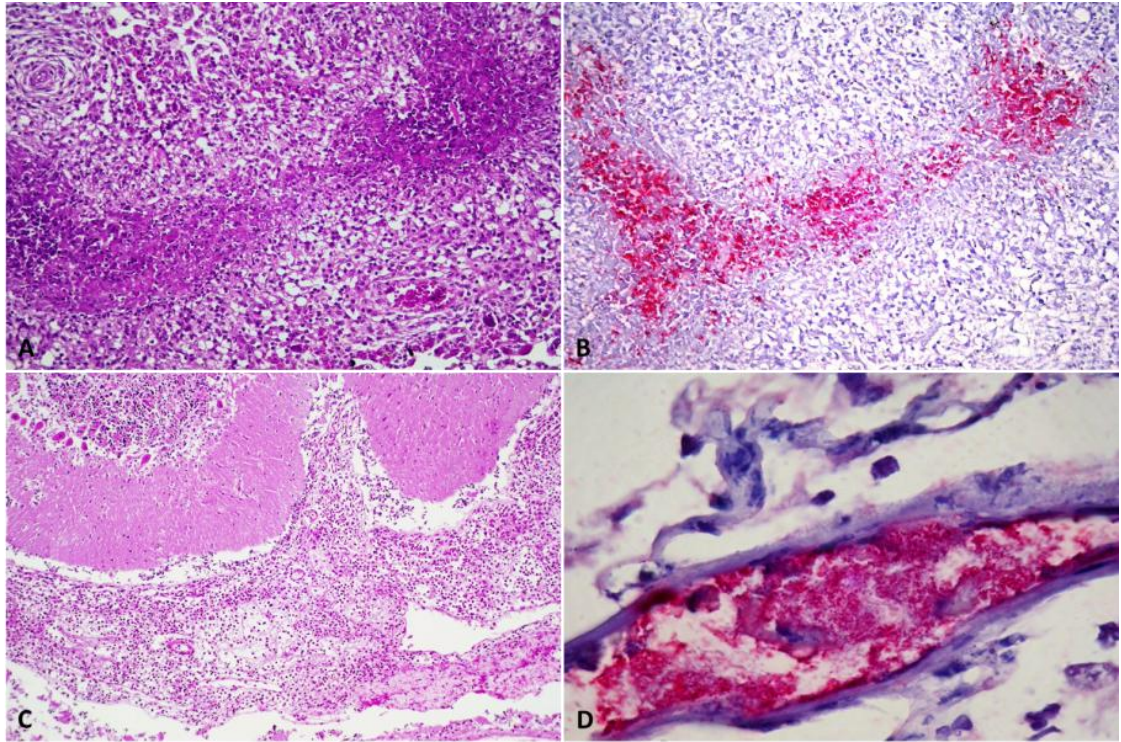


Figura 2. Fetos bovinos abortados infectados por *Brucella abortus*. A. Pulmão. Broncopneumonia necro-supurativa multifocal acentuada. Obj.10X, HE. B. Pulmão. Marcação em vermelho de antígenos bacterianos pela técnica de imuno-histoquímica para *B. abortus* em focos necróticos. Obj.10X, IHQ. C. Cerebelo. Meningite granulomatosa focalmente extensa acentuada. Obj.4X, HE. D. Placenta. Marcação em vermelho de antígenos bacterianos pela técnica de imuno-histoquímica para *B. abortus* no interior de vaso sanguíneo. Obj.40X, HE.

#### 4. ARTIGO 3

Neste item é apresentado o artigo “*Bovine Abortion due to Geotrichum candidum Infection*” submetido à publicação no periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.



## **BOVINE ABORTION DUE TO *Geotrichum candidum* INFECTION**

Nadia A B Antoniassi<sup>1</sup>, Gregory D Juffo<sup>1</sup>, Adriana S Santos<sup>2</sup>, Caroline Argenta Pescador<sup>3</sup>, Laerte Ferreiro<sup>4</sup>, David Driemeier<sup>1</sup>

1 Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

2 Setor de Patologia Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

3 Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT

4 Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

Corresponding Author: David Driemeier - [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

**Abstract.** *Geotrichum* spp. are ubiquitous, saprophytic fungi found in soil, organic matter, silage, as a contaminant in food products and in the digestive tract of humans and other mammals. They have been associated with mastitis in cattle and have been isolated from reproductive tracts of cows and buffaloes with and without reproductive problems. This paper reports a case of *Geotrichum candidum* infection in an aborted bovine fetus with skin and lung lesions. A six-month-old aborted male Holstein Friesian fetus was examined. Macroscopically, the skin from the abdomen, thorax, and head was excessively thickened and wrinkled. These changes corresponded to orthokeratotic hyperkeratosis, intracorneal microabscesses, pyogranulomatous inflammatory infiltrate and superficial dermal necrosis. Moderate suppurative pneumonia was observed in the lungs, along with large numbers of mononuclear cells and occasional fibrin thrombi within blood vessels, including in the central nervous system. Grocott's silver staining revealed fungal structures on the skin. The mycological exam showed the growth of *G. candidum*, and the phase contrast microscopy carried out on the abomasal fluid revealed hyphae compatible with the agent. The skin lesions observed in association with the isolation of the fungus indicate that the abortion was due to *G. candidum* infection of the bovine fetus. The possibility of this infection as a cause of abortion in cattle should be considered.

**Key words:** bovine; Mycotic abortion; *Geotrichum candidum*;

Mycotic infections can cause placentitis and abortion in a number of animal species.<sup>1</sup> Fungi are common causes of bovine abortion worldwide and are associated with 1-24.9 % of all bovine abortions.<sup>7</sup> Such infections are sporadic and rarely affect more than one animal in a herd; they occur mainly during the winter period when the cows are generally fed on large amounts of hay.<sup>16</sup> This phenomenon is more evident under conditions of low aeration and high humidity, which promote fungal growth.<sup>2</sup> When a pregnant cow contracts a fungal infection, the spores can penetrate through lesions in the gastric or respiratory tract and reach the placenta and the fetus, where conditions are ideal for their full development.<sup>12</sup>

Bovine mycotic abortion generally occurs between the sixth and eighth months of gestation and is frequently followed by retention of the placenta. Hemorrhagic necrotizing placentitis is frequently observed in the placenta and is generally associated with necrotic, thick yellow cotyledons.<sup>16</sup> In the fetus, parakeratotic dermatitis is generally evident and characterized by raised plaques and blepharitis.<sup>12</sup> The diagnosis of mycotic abortion requires macroscopic evaluation, histopathological examination and culture testing, mainly of the placenta and abomasal content.<sup>8</sup>

Fungi species that have been isolated from aborted fetuses include *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Absidia corymbifera*, *Mortierella wolfii*, apart from species in the genera *Rhizopus*, *Mucor*, and *Rhizomucor*.<sup>2,5</sup> In Brazil, cases of bronchopneumonia in bovine fetuses have been attributed to infection by *A. fumigatus* and *A. niger*.<sup>7</sup>

*Geotrichum* spp. are ubiquitous saprophytic fungi that are found in soil, decomposing organic matter and silage, as a contaminant in food products and in the digestive tract of mammals, including humans.<sup>4</sup> They have been associated with skin lesions in horses,<sup>10</sup> and clinical mastitis in cattle, and they have been isolated from the reproductive tracts of cows and buffalos with and without reproductive problems.<sup>6,11</sup> Widespread infections, cerebral abscesses, traumatic joint infections, and oral and cutaneous infections in immunocompromised patients have been reported in conjunction with *Geotrichum* infection in humans.<sup>23,15</sup>

This communication reports a case of *Geotrichum candidum* infection associated with skin and lung lesions in an aborted bovine fetus, highlighting the importance of *G. candidum* as a cause of abortion in cattle.

In July 2008, a male Holstein Frisian fetus was submitted to the Setor de Patologia Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul for diagnostic purposes. The fetus was subjected to a necropsy, and its gestational age was estimated from the crown-rump length.<sup>3</sup> Fragments of the brain, lung, liver, kidney, heart, skeletal muscle, thymus, spleen, abomasum and skin were collected in a 10 % buffered formalin solution, processed for routine histological examination, and stained using hematoxylin and eosin (H&E) and Grocott's Methenamine Silver (GMS). Samples of the abomasal contents were collected aseptically and analyzed by phase contrast microscopy and mycological culture in Sabouraud agar with chloramphenicol at 27° C. Liver and lung fragments and the abomasal contents were collected aseptically and submitted to aerobic and microaerobic bacterial culture in blood agar medium supplemented with 5 % sheep's blood for aerobic bacteria and *Brucella* spp., respectively. For *Campylobacter* spp., BHI (brain heart infusion) medium.<sup>20</sup> Impressions of the kidney sections were tested for *Leptospira* spp. by direct immunofluorescence with a commercial multivalent antibody at a dilution of 1:20.<sup>18</sup> Fragments of the thymus and central nervous system were submitted to immunohistochemical tests with an anti-BVDV monoclonal antibody<sup>a</sup> at a dilution of 1:500 in PBS. Antigen recovery was carried out with 0.05 % protease for 15 min at 37° C, and nonspecific markers were blocked through the application of 5 % skim milk for 15 min. The primary antibody was applied for 45 min at 37° C, followed by the biotinylated secondary antibody and an alkaline phosphatase-conjugated avidin solution<sup>b</sup> for approximately 20 min each at ambient temperature. The chromogen used was Permanent Red<sup>c</sup>. Positive controls were inserted simultaneously with the slides tested. The slides were counterstained with hematoxylin for approximately 1 min.<sup>22</sup> Anti-BHV1 immunohistochemical tests were carried out using a polyclonal antibody<sup>d</sup> in a 1:200 dilution in liver tissue. A 3 % hydrogen peroxide solution was applied for 10 min to block endogenous peroxidase activity. The antigen was recovered by heating the slides in a citrate buffer solution (pH 6.0). Nonspecific signals were blocked by the application of 5 % skim milk for 15 min. The primary antibody was applied for 45 min at a temperature of 37° C, followed by the biotinylated secondary antibody and peroxidase-conjugated avidin for approximately 20 min each, at ambient temperature. The development of the labeling was carried out using the chromogen 3,5-diaminobenzidine tetrahydrochloride<sup>e</sup> for 5 to 10 min. The slides were counterstained with hematoxylin for 1 min.

The aborted fetus originated from a small dairy farm located in southern Brazil. The farmer reported the occurrence of additional abortions in that same period. The gestational age of the fetus was estimated at 6 months, according to the crown-rump length of 51 cm. At necropsy, abnormalities were observed mainly on the skin, which was excessively thickened and wrinkled in the thoracic, abdominal and head regions, particularly on the eyelids, ears and close to the nose (figs. 1 and 2). The lungs were partially expanded.

Histological examination of the skin revealed diffuse accentuated orthokeratotic hyperkeratosis with the formation of intracorneal microabscesses and moderate multifocal pyogranulomatous inflammatory infiltrate associated with areas of superficial dermal necrosis and intravascular fibrin thrombi. GMS staining revealed fungal structures in foci of skin necrosis in association with dermal thrombi (fig. 3). Moderate suppurative pneumonia was observed in the lungs, along with large numbers of mononuclear cells and occasional fibrin thrombi within the blood vessels, which were also present in the cerebral vessels.

After 6 days of incubation, inoculated culture plates exhibited growth of *Geotrichum candidum*, characterized by the development of white-cream smooth colonies (4-5 cm in diameter) without reverse pigment. Phase contrast microscopy of the abomasal fluid revealed septate hyaline hyphae with branching originating cylindrical to subglobose arthroconidia chains. The germ tube test was negative. Direct immunofluorescence tests for *Leptospira* spp., bacteriological tests and anti-BVDV and BHV-1 immunohistochemical tests were all negative.

The reported prevalence of bovine mycotic abortion in Brazil is 3.4 %.<sup>8</sup> Studies in other countries have reported a variable prevalence rate, from 1 to 24.9 %.<sup>1,14,16</sup> *Aspergillus fumigatus* is the most common species identified in cases of bovine mycotic abortion and is isolated in approximately 60 to 75 % of cases.<sup>1</sup> *Geotrichum candidum* has been reported as a cause of systemic mycosis in dogs, cats and humans,<sup>13,19,21</sup> gastrointestinal infections in gorillas,<sup>9</sup> clinical mastitis in cattle<sup>6</sup> and endometritis in cattle and buffalo.<sup>24</sup> However, until recently, abortions have not been associated with this agent.

Mycotic infections by *G. candidum* are considered opportunistic and are most likely related to immunosuppressive factors.<sup>16</sup> Factors associated with a greater susceptibility to fungal infections include previous immunosuppressive diseases, the

prolonged use of antibiotics or hydrocortisone and poor physical condition. In this case, there was no evidence suggesting that the animal in question was immunocompromised.

Mycotic abortions are generally associated with the ingestion of food products that have been inadequately preserved and exposed to high humidity, resulting in fungal contamination.<sup>16</sup> The case reported here occurred in July, during the local winter, a period when rains are more frequent and the air humidity is higher; however, information about the feed consumed by this small herd was not available.

Mycotic abortion is characterized by fungal infection of the placenta and amniotic contamination associated with fetal infection through contact with the skin and/or through aspiration of contaminated amniotic fluid, which lead to fungal dermatitis and pneumonia. The live or dead fetus is then expelled at some point during the gestation. Partial alveolar expansion was observed in the present case, which indicates that the fetus was alive at the moment it was expelled from the uterus. Most mycotic abortions occur during the final third of the gestation period, as observed in the case of this fetus. It is possible that the incubation period in fungal abortions is dependent on the infection dose and that a longer period is necessary in cases of low doses.

In cases of mycotic abortion, the placenta is the main organ affected. In studies on bovine placentas,<sup>17</sup> observed that of 55 cases in which the placenta contained fungal hyphae, only 7 % of the fetuses had some type of macro or microscopic lesion. However, in most of the fetuses analyzed at SPV, the placenta was not present, suggesting that the occurrence of mycotic abortions may be underestimated. The case reported here also did not include an associated placenta for analysis; however, the fetus was found to have lesions that strongly indicated mycotic infection, and the isolation of the fungus was successful, facilitating the diagnosis. The skin lesions observed were similar to those in other cases of mycotic abortion<sup>7</sup> characterized by raised gray plaques, which were rounded or confluent and appeared mainly in the head and neck region, corresponding to microscopic findings of dermatitis and hyperkeratosis. Lung and liver lesions are often not observed in cases of mycotic abortion, but when present, they are characterized by suppurative inflammation or granulomatosis associated or not with fungal hyphae,<sup>7</sup> as found in this case.

The observations of macroscopic and histological lesions, together with the isolation of the fungus, verified infection by *Geotrichum candidum* as the agent that caused the abortion. Information associated with bovine abortion due to *G. candidum* is scarce. Mycotic agents should be investigated in routine diagnosis, and the diagnosis of mycotic abortion should be carried out only when lesions associated with mycotic elements compatible with cultured isolates are present.

### **Sources and manufacturers**

a 15C5 Anticorpo anti-BVDV Purified , Syracuse Bioanalytical, Inc.

b Kit LSAB-AP. Code K0689. 6392 Vila Real Carpinteria, California 93013 USA.

c Liquid Permanent red. Code K0640. 6392 Vila Real Carpinteria, California 93013 USA.

d Anticorpo Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus/ Bovine Herpesvirus Type 1 (IBR/BHV-1), Anti-viral Antiserum, catalog no.: 210-70-IBR. Description: Anti-IBR polyclonal antiserum. Goat origin. Empresa: VMRD. PO Box 502, Pullman, WA 99163 USA.

e Liquid DAB + Substrate. Code K3468. 6392 Vila Real Carpinteria, California 93013 USA.

### **References**

1. Ainsworth GC, Austwick PKC: 1973, Mycotic abortion In: Fungal Diseases of Animals. 2 ed. Commonwealth Agriculture Bureaux, Farnham Royal, Slough, England 74-80.
2. Ali R, Khan IH: 2006, Mycotic abortion in cattle. Pak Vet J 26:44-46.
3. Barr CB, Anderson ML, Blanchard PC, et al.: 1990, Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. Vet Path 27:354-361.
4. Bonifaz A, Vázquez-González D, Macías B, et al.: 2010, Oral geotrichosis: report of 12 cases. J Oral Sci 3:477-483.

5. Carter ME, Cordes DO, Mennea ME, Hunter R: 1973, Fungi Isolated from Bovine Mycotic Abortion and Pneumonia with Special Reference to *Mortierella wolffi*. Res Vet Sci 14:201-206.
6. Chahota R, Katoch R, Mahajan A, Verma S: 2001, Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. Veterinarski Arhiv, 71(4):197-201.
7. Corbellini LG, Pescador CA, Frantz FJ, et al.: 2003, Aborto por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* em bovinos no sul do Brasil (Abortion by *Aspergillus fumigatus* and *A. niger* in cattle in southern Brazil). Pesq Vet Bras 23(2):82-86. (In Portuguese. Abstract in English).
8. Cruz LCH, Rosa CAR: 1981, Aborto micótico em bovinos: considerações sobre o diagnóstico e revisão da literatura relevante (Mycotic abortion in cattle: considerations on the diagnosis and review of relevant literature). Rev Bras Med Vet 4(1):16-19. (In Portuguese).
9. Dolensek EP, Napolitano RL, Kazimiroff J: 1977, Gastrointestinal geotrichosis in six adult gorillas. J Am Vet Med Assoc 171:975-976.
10. Figueredo LA, Cafarchia C, Otranto D: 2011, *Geotrichum candidum* as etiological agent of horse dermatomycosis. Vet Microbiol 148:368–371.
11. Garoussi MT, Khosrave AR, Havareshti P: 2007, Mycoflora of cervicovaginal fluids in dairy cows with or without reproductive disorders. Mycopath 164:97-100.
12. Givens MD, Marley SMD: 2008, Infectious causes of embryonic and fetal mortality. Theriogenology 70:270-285.
13. Henrich TJ, Marty FM, Milner Jr DA, Thorner AR: 2009, Disseminated *Geotrichum candidum* infection in a patient with relapsed acute myelogenous leukemia following allogeneic stem cell transplantation and review of the literature. Transpl Infect Dis 11(5):458-462.
14. Jarret IV, McOrist S, Waddington J, et al.: 1984, Diagnostic studies of the fetus, placenta and maternal blood from 265 bovine abortions. Cornell Vet 74(1):8-20.
15. Kassamali H, Anaissie E, Ro J, et al.: 1987, Disseminated *Geotrichum candidum* infection. J Clin Microbiol 25:1782-1783.



16. Knudtson WU, Kirkbride CA: 1992, Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). *J Vet Diagn Invest* 4:181-185.
17. McCausland IP, Slee KJ, Hirst FS: 1987, Mycotic abortion in cattle. *Aust Vet J* 64(5):129-132.
18. Miller DA, Wilson MA, Kirkbride CA: 1989, Evaluation of multivalent leptospira fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J Vet Diagn Invest* 1(2):146-149.
19. Pal M: 2005, Role of *Geotrichum candidum* in canine oral ulcers. *Rev Iberoam Micol* 22:183.
20. Plastridge WN, Koths ME, Williams LF: 1961, Antibiotic mediums for the isolation of vibrios from bull semen. *Am J Vet Res* 22:867-871.
21. Reppas GP, Snoeck T.D: 1999, Cutaneous geotrichosis in a dog. *Aust Vet J* 77:567-569.
22. Schmitz M: 2006, Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (Pathological and immunohistochemical characterization of infection with bovine viral diarrhea). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 63p. (In Portuguese. Abstract in English).
23. Sharma S, Singh M, Vasishta NK, Sharma NS: 2008, Mycotic isolations from the uterus of endometritic cows and buffaloes in Himachal Pradesh. *Indian J Anim Sci* 78(9):961-962.
24. Verma S, Katoch RC, Jand SK, et al.: 1999, Mycobiotic Flora of Female Genitalia of Bufaloes and Cows with Reproductive Disorders. *Vet Res Com* 23:337-341.



Figure 1: Aborted bovine fetus. Thickened and wrinkled skin, especially in the head, thorax, and abdomen.



Figure 2: Detail of the former figure showing the thickened and wrinkled skin on the eyelids, ears and nose.

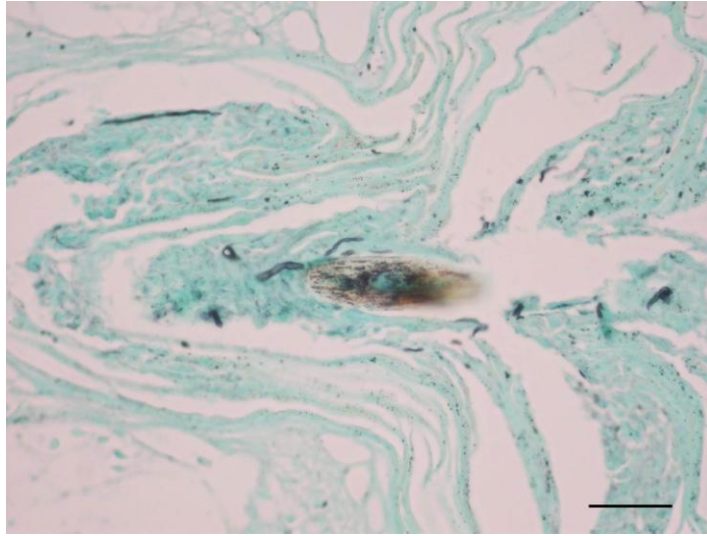


Figure 3: GMS staining. Fungal structures at foci of necrosis in association with dermal features.

## 5. ARTIGO 4

Neste item é apresentado o artigo “**Malformações multissistêmicas em um feto bovino abortado**” aceito para publicação na revista *Acta Scientiae Veterinariae*.

## Malformações congênicas multissistêmicas em um feto bovino abortado

Congenital Multisystemic Malformations in an Aborted Bovine Fetus

Daniele Mariath Bassuino<sup>1</sup>, Fabiana Wurster<sup>1</sup>, Gregory Duarte Juffo<sup>1</sup>, Gisele Silva Boos<sup>1</sup>,  
Adriana da Silva Santos<sup>2</sup>, Nadia Aline Bobbi Antoniassi<sup>3</sup> & David Driemeier<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Congenital anomalies are structural and functional abnormalities that are present at birth, and they are frequently the result of environmental or genetic factors or both. Their etiology may also be related to infectious agents, such as viruses, hereditary factors, or the ingestion of toxic plants or chemical agents. Congenital anomalies usually occur sporadically, but they also can occur as outbreaks. The objective of this paper is to describe the multiple congenital malformations observed in an aborted bovine fetus.

**Case:** A bovine fetus was sent to Laboratory Veterinary Pathology UFRGS for necropsy, histological analysis and complementary exams such as bacteriology, direct immunofluorescence for *Leptospira* sp. and immunohistochemistry for bovine viral diarrhoea virus (BVDV). The fetus presented multiple congenital alterations, such as dextraposition of the aorta and absence of the pulmonary artery, tracheal stenosis, a hypoplastic lung, multiple heart defects, arthrogryposis, osteopetrosis, and the absence of the middle phalanx and accessory digits in the forelimbs. Furthermore, dystocia and enlargement of the liver were observed, the organ showed irregular surface, firm consistency and nodular formation. A histological exam verified the accentuated hepatic periportal fibrosis. All complementary exams were negative.

**Discussion:** Congenital anomalies can affect only one organ or can be multisystemic due to a malformation of one part of the body leading to the loss of another. Arthrogryposis can delay delivery, and signs of dystocia may be present in the resulting fetus. The etiology of arthrogryposis is difficult to determine, and even studies that were previously performed in ruminants have failed to identify a specific agent. Osteopetrosis, which was also observed, is a congenital skeletal anomaly caused by the failed resorption of cartilage and endochondral bone, and it has been associated with intrauterine BVDV infections, can also be associated with autosomal recessive genes in the Angus bovine breed. Congenital heart defects are relatively rare in cattle. Ventricular sept defects and transposition of the great vessels are two of the most common cardiovascular anomalies in bovines, and they can occur individually or in association with other heart defects. Generally, these malformations are linked to genetic factors. In this study, the animal presented with several conformational heart defects that resulted in embryonic development alterations in its structure or that resulted in progressive heart failure. Blood flow changes caused by an anatomic defect can significantly influence the structural and functional development of the circulation, resulting in secondary alterations. In this case, the primary defect is hard to determine, but the observed bilateral pulmonary hypoplasia may be the consequence of a blood flow decrease to the lungs because the pulmonary artery was absent. Pulmonary hypoplasia is defined as the incomplete development of the lungs, reducing the number of divisions of the bronchial tree and the associated alveoli. Many causes of pulmonary hypoplasia have been described in human beings and animals, such as chest abnormalities, congenital diaphragmatic hernia, chromosome anomalies, musculoskeletal disorders and heart failure. The accentuated hepatic fibrosis observed in this study, which was predominantly periportal, correlated with congestive heart failure due to the cardiac and pulmonary malformation observed in the fetus, which would have altered the systemic blood flow. It is suggested that the studied case is a congenital malformation of sporadic origin, characterized by multiple deformities associated with unknown genetic factors.

**Keywords:** abortion, bovine, multiple congenital malformations.

**Descritores:** aborto, bovino, malformações congênicas múltiplas.

Received: February 2012

[www.ufrgs.br/actavet](http://www.ufrgs.br/actavet)

Accepted: May 2012

<sup>1</sup>Setor de Patologia Veterinária (SPV) Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>2</sup>Doutoranda, Setor de Patologia Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil. <sup>3</sup>Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Médica Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil. CORRESPONDENCE: D. Driemeier [davepat@ufrgs.br - TEL: +55 (51) 3308-6107]. Faculdade de Veterinária - UFRGS, Av. Bento Gonçalves n. 9090, Bairro Agronomia, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

## INTRODUÇÃO

Malformações congênitas são anormalidades estruturais e funcionais de tecidos, órgãos e/ou sistemas que podem ocorrer nas fases de desenvolvimento embrionário ou fetal [4,6,13]. Possuem distribuição mundial e podem levar ao aborto ou morte perinatal gerando perdas reprodutivas [4,14,19,20].

A etiologia pode estar relacionada a agentes infecciosos, como aos vírus da diarreia viral bovina (BVDV), de Akabane e o da Língua Azul, assim como a fatores hereditários, ingestão de plantas tóxicas e agentes químicos [4,6,13,22]. Normalmente ocorrem de forma esporádica, embora também possam ocorrer na forma de surtos [4,19,21].

A frequência de defeitos congênitos varia em uma população animal, sendo estimada nos bovinos entre 0,3-3% [13,14,21]. No Rio Grande do Sul, em um levantamento realizado em fetos bovinos abortados, a prevalência foi de 3,5% no total de 307 casos analisados [19]. Estas malformações congênitas, esporádicas e hereditárias, que afetam principalmente o sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, pele, globo ocular e os sistemas hematopoiético e digestivo já foram descritas em bovinos, búfalos, caprinos e ovinos em algumas regiões do Brasil [6]. Entretanto, informações sobre a ocorrência de anomalias congênitas são escassas no nosso país [14].

O objetivo deste trabalho é relatar a ocorrência de malformações congênitas múltiplas em um feto bovino abortado examinado no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

## RELATO DE CASO

Um feto bovino, fêmea, com idade gestacional de aproximadamente 9 meses, sem raça informada, foi enviado ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para realização da necropsia. A procedência e dados sobre histórico da matriz e da propriedade não foram informados. Os órgãos foram analisados macroscopicamente e coletados em formol tamponado a 10%, processados rotineiramente para exame histológico e corados por hematoxilina e eosina. Para exame de imunofluorescência direta para *Leptospira* sp. foram utilizadas impressões de secções de rim. Para cultivo bacteriano aeróbio em meio Ágar sangue e Ágar MacConkey incubados a 37°C, foram encami-

nhados pulmão, fígado e conteúdo abomasal para o Laboratório de Bacteriologia da UFRGS. Fragmentos de timo e sistema nervoso central foram submetidos à análise imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpo monoclonal anti-BVDV<sup>1</sup>, na diluição de 1:500 em PBS. A recuperação antigênica foi feita com protease 0,05% por 15 min a 37°C e as ligações inespecíficas foram reduzidas a partir da aplicação de leite desnatado Molico® a 5% por 15 min. O anticorpo primário foi incubado durante 50 min à temperatura de 37°C, seguido do anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina por aproximadamente 20 min cada, à temperatura ambiente. Vermelho permanente<sup>2</sup> foi o cromógeno utilizado e as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 min. Controles positivos foram inseridos simultaneamente com as lâminas testadas [23].

Durante a necropsia observou-se evidências de parto distócico, caracterizadas por edema submandibular e sublingual acentuado (Figura 1). Verificou-se contratura muscular e articular simétrica e bilateral dos membros (artrogripose). Ausência da falange medial e dígitos acessórios do membro torácico direito. Aumento da densidade óssea com diminuição do canal medular nos ossos dos membros e crânio (osteopetrose). O fígado estava aumentado de tamanho, com superfície irregular, consistência firme e formações nodulares (Figura 2). A traqueia apresentava estenose em seu terço final, terminando em uma pequena estrutura de aproximadamente 3 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro que correspondia ao pulmão hipoplásico (Figura 3). No coração, se identificou um único átrio que se comunicava com o ventrículo através de um orifício, e este apresentava valvas rudimentares. O ventrículo direito consistia de uma pequena saculação de 3,5 cm e comunicava-se com o ventrículo esquerdo por uma falha na parede interventricular, de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro. Havia ainda, dextroposição do tronco aórtico e ausência do tronco pulmonar (Figura 4). Microscopicamente, notou-se fibrose hepática acentuada, predominantemente periportal, por vezes em ponte. Os demais órgãos, inclusive o pulmão, apresentaram características histológicas normais. Ao exame microbiológico não houve crescimento bacteriano significativo. Os exames de imunofluorescência direta para *Leptospira* sp. e IHQ para BVDV foram negativos.



**Figura 1.** Malformações multissistêmicas em um feto bovino abortado. Artrogripose e ausência da falange medial e dígitos acessórios do membro torácico direito.



**Figura 2.** Malformações multissistêmicas em um feto bovino abortado. Fígado aumentado de tamanho, com superfície irregular, consistência firme e formações nodulares.



**Figura 3.** Malformações multissistêmicas em um feto bovino abortado. Traqueia com estenose em seu terço final, terminando no pulmão hipoplásico.



**Figura 4.** Malformações multissistêmicas em um feto bovino abortado. Coração com um único átrio (A); Valvas átrio ventriculares rudimentares; Ventriculo direito (ponta de seta) consistindo em uma pequena saculação de 3,5 cm e comunicando-se com o ventrículo esquerdo (VE) por falha na parede interventricular, de aproximadamente 2,5cm de diâmetro. Dextro-posição do tronco aórtico e ausência do tronco pulmonar.

#### DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve aspectos macroscópicos e histopatológicos de um caso de malformações congênicas múltiplas em um feto bovino abortado. Anomalias congênicas podem afetar apenas um órgão ou sistema ou serem multissistêmicas, decorrentes, de uma malformação de uma parte do corpo que conduz ao prejuízo de outra [9,17,18]. Além disso, diferentes órgãos podem ser afetados devido a um único cromossomo que carrega as informações genéticas por diversas vias metabólicas [18].

Artrogripose, que é a alteração mais comum em caso de malformação [19] frequentemente é causa

de dificuldades ao parto [2], podendo estar relacionado com os sinais de distocia encontrados neste feto. Artrogripose é caracterizada como uma contração persistente nas articulações, normalmente de forma simétrica e bilateral [2,7]. Sabe-se que é de difícil determinação etiológica [19]. No entanto, a transmissão hereditária e os agentes teratogênicos estão entre as principais causas descritas [2]. A infecção intrauterina pelo vírus Akabane em bovinos nos Estados Unidos tem sido associada com artrogripose em fetos abortados [10,11], nesta infecção são encontradas lesões microscópicas no SNC caracterizadas por degeneração walleriana, encefalomielite ge perivasculite mononuclear [19]

as quais não foram observadas nesse caso. Casos de infecção pelo vírus Akabane ainda não foram relatados no Brasil [24]. Outro agente conhecidamente causador de aborto e anomalias congênicas é o Vírus da Língua Azul. Pesquisas demonstram a soropositividade em vários Estados do país, com uma soroprevalência de 1,22% no Rio Grande do Sul [12]. Entretanto somente dois relatos de doença clínica foram realizados no país, um no Paraná [5] e outro no Rio Grande do Sul [1], e nenhum deles associados a malformações congênicas o que sugere uma baixa associação entre o vírus e os defeitos congênicos observados nesse caso.

A osteopetrose, observada neste feto é uma anomalia congênita, decorrente da falha na reabsorção do osso endocondral e cartilagem, enquanto que a formação óssea continua o seu crescimento normal [26], levando a uma formação de ossos densos e uma diminuição no canal medular [19]. Infecções intrauterinas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) tem sido associadas, universalmente, com a osteopetrose [25,26], além de lesões no SNC, tais como hipoplasia cerebelar, hidrocefalia e porencefalia [16]. Neste caso, não foram observadas tais lesões no SNC, além de o exame de IHQ para BVDV ter sido negativo. Outra possibilidade, para casos de osteopetrose é a associação com genes autossômicos recessivos em bovinos da raça Angus [25,26].

O feto apresentou ainda, ausência de falange e de dígitos acessórios do membro torácico direito. Síndromes caracterizadas pela ausência total ou parcial das falanges tem sido descritas em bovinos e ovinos [25], e afetam mais frequentemente a parte distal do membro [9].

Os defeitos cardíacos congênicos são relativamente raros em bovinos [3]. As deformidades de septo ventricular e transposições dos principais vasos estão entre as anomalias cardiovasculares mais comuns em bovinos, podendo ocorrer isoladamente ou de forma associada com outros defeitos cardíacos [17]. Geralmente estas malformações estão associadas a fatores genéticos, entretanto acredita-se que algumas infecções possam estar também associadas a anomalias em animais domésticos [15]. Este feto apresentou diversas falhas na conformação cardíaca como dextroposição do tronco aórtico, aplasia de tronco pulmonar, defeitos em septos atriais e ventriculares e valvas atrioventriculares rudimentares. As alterações cardíacas congênicas resultam de alterações no desenvolvimento embrionário de uma estrutura normal ou da falha de progressão de tal estrutu-

ra além de um estágio inicial. O fluxo sanguíneo alterado determinado por um defeito anatômico pode, por sua vez, influenciar significativamente o desenvolvimento estrutural e funcional do restante da circulação, podendo ser responsável por alterações secundárias [8]. É difícil determinar o defeito primário neste caso, entretanto a hipoplasia bilateral pulmonar, observada nesse feto, pode ser consequência da diminuição do fluxo sanguíneo para esse órgão, uma vez que a artéria pulmonar estava ausente. A hipoplasia pulmonar é o desenvolvimento incompleto de um ou ambos os pulmões, resultando na redução do número de divisões da árvore brônquica e seus alvéolos associados. Várias são as causas descritas em humanos e animais, como, anormalidades da caixa torácica, hérnias diafragmáticas congênicas, anormalidades cromossômicas, desordens musculoesqueléticas severas e alterações cardíacas [8,15].

Microscopicamente, somente no fígado foi observada lesão significativa, que se caracterizou por fibrose hepática acentuada, predominantemente periportal, por vezes em ponte. Tal alteração foi correlacionada à insuficiência cardíaca congestiva devido as malformações cardíacas e pulmonares presentes nesse feto, resultando em alterações no fluxo sanguíneo sistêmico normal.

Baseado nos aspectos macro e microscópicos observados neste feto complementados aos resultados dos exames bacteriológicos, de IFD para leptospirose e de IHQ para BVDV, somado a baixa prevalência sorológica para o Vírus da Língua Azul, encontrada em estudos realizados no RS e a ausência de casos de infecção pelo Vírus de Akabane no Brasil, sugere-se que o caso relatado se trate de uma malformação congênita de ocorrência esporádica, caracterizada por deformações múltiplas e associada a fatores genéticos não determinados.

#### NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>Clone 15C5, Syracuse, USA.

<sup>2</sup>Permanent red/code 0695, Dako Cytomation, Carpinteria, USA.

*Agradecimentos.* Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Declaration of interest.* The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.



REFERÊNCIAS

- 1 Antoniassi N.A.B., Pavarini S.P., Ribeiro L.A.O., Silva M.S., Flores E.F., & Driemeier D. 2010. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(12): 1010-1016.
- 2 Belli C.B., Molina L.R.P. & Netto D.M. 2007. Relato de caso de artrogripose em caprino. *ARS Veterinaria*. 23(2): 67-70.
- 3 Buczinski S., Fecteau G. & DiFruscia R. 2006. Ventricular septal defects in cattle: A retrospective study of 25 cases. *The Canadian Veterinary Journal*. 47: 246-252.
- 4 Campos K.F., Sousa M.G.S., Silva N.S., Oliveira C.H.S., Duarte M.D., Barbosa, J.D. & Oliveira C.M.C. 2009. Doenças congênitas em bovinos diagnosticadas pela Central de Diagnóstico Veterinário (CEDIVET) da Universidade Federal do Pará, no período de 1999 a 2009. In: *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria* (Belo Horizonte, Brasil). p.13.
- 5 Clavijo A., Sepulveda L., Riva J., Pessoa-Silva M., Tailor-Ruthes A. & Lopes J.W. 2002. Isolation of Bluetongue Virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *The Veterinary Record*. 151: 301-302.
- 6 Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Galiza G.J.N., Pimentel L.A., Anjos B.L. & Mota R.A. 2010. Malformações congênitas em ruminantes no semiárido do nordeste brasileiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(10): 807-815.
- 7 Druziani J.T., Favaretto L., Novaski E., Peres, J.A., Guimarães G.C., Birk A.J. & Filadelpho A.L. 2010. Artrogripose, braquignatismo e palatosquise em bovino da raça Nelore - Relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 15: 1-6. [Fonte: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria15/relatos/ANOIIIIEDI15RC04.pdf>>]
- 8 Friedman W.F. & Silverman N. 2005. Doenças do coração, pericárdio e leito vascular: cardiopatia congênita no lactente e na criança. In: *Braunwald, Zipes, Libby Tratado de Medicina Cardiovascular*. v.1. 6.ed. Rio de Janeiro: Roca, pp.1551-1642.
- 9 Islan M.R., Roh Y.S., Cho A., Park H., Heo S., Lee K., Lee H., Lim C. & Kim B. 2011. Multiple congenital anomalies in a Korean native calf (*Bos taurus coreanae*). *Korean Journal of Veterinary Research*. 51(1): 55-59.
- 10 Konno S., Moriwaki M. & Nakagawa M. 1982. Akabane disease in cattle: Congenital abnormalities caused by viral infection. Spontaneous disease. *Veterinary Pathology*. 19(3): 246-266.
- 11 Konno S. & Nakagawa M. 1982. Akabane disease in cattle: Congenital abnormalities caused by viral infection. Experimental disease. *Veterinary Pathology*. 19(3): 267-279.
- 12 Lager I.A. 2004. Bluetongue virus in South America overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *The Italian Journal of Animal Science*. 40(3): 89-93.
- 13 Macêdo J.T.S.A., Lucena R.B., Giarretta P.R., Kommers G.D., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2011. Defeitos congênitos em bovinos da Região Central do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(4): 297-306.
- 14 Marcolongo-Pereira C., Schild A.L., Soares M.P., Vargas Jr. S.F. & Riet-Correa F. 2010. Defeitos congênitos diagnosticados em ruminantes na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(10): 816-826.
- 15 Maxie M.G. & Robinson W. 2007. Cardiovascular system. In: Maxie M.G. (Ed). *Jubb K.V.F, Kennedy P.C. & Palmer N. Pathology of Domestic Animals*. v.3. 5th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp.2-51.
- 16 Maxie M.G. & Youssef S. 2007. Nervous system. In: Maxie M.G. (Ed). *Jubb K.V.F, Kennedy P.C. & Palmer N. Pathology of Domestic Animals*. v.1. 5th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp.283-455.
- 17 Newman S.J., Bailey T.L., Jones J.C., DiGrassie W.A. & Whittier W.D. 1999. Multiple congenital anomalies in a calf. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11(4): 368-371.
- 18 Noh D.H., Jeong W.L., Lee C.S., Jung C.Y., Chung J.Y., Jee Y.H., Do S.H., An M.Y., Kwon O.D., Williams B.H. & Jeong K.S. 2003. Multiple congenital malformation in a Holstein calf. *Journal of Comparative Pathology*. 129: 313-315.
- 19 Pavarini S.P., Sonne L., Antoniassi N.A.B., Santos A.S., Pescador C.A., Coberllini L.G. & Driemeier D. 2008. Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(3): 149-154.
- 20 Rivera H.G. 2001. Causas frecuentes de aborto bovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 12(2): 117-122.
- 21 Schild A.L. 2007. Defeitos congênitos. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. v.1. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, pp.25-55.
- 22 Schlafer D.H. & Miller R.B. 2007. Female genital system. In: Maxie M.G. (Ed). *Jubb K.V.F, Kennedy P.C. & Palmer N. Pathology of Domestic Animals*. v.3. 5th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp.431-563.

- 23 Schmitz M. 2006. Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina. 63f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 24 Schmidt V. & Oliveira R.T. 2004. Artrogripose em caprino: Relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 56(4): 38-440.
- 25 Thompson K. 2007. Bones and joints. In: Maxie M.G. (Ed). *Jubb K.V.F, Kennedy P.C. & Palmer N. Pathology of Domestic Animals*. v.1. 5th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp.2-180.
- 26 Wolf D.C. & Van Alstine W.G. 1989. Osteopetrosis in Five Fetuses from a Single Herd of 16 Cows. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1(3): 262-264.

## 6. ARTIGO 5

Neste item é apresentado o artigo “**Condrodisplasia tipo Dexter em fetos bovinos abortados**” aceito para publicação na revista *Acta Scientiae Veterinariae*.

## Condrodisplasia tipo Dexter em fetos bovinos abortados

Chondrodysplasia Dexter Type in Aborted Bovine Fetuses

Fabiana Wurster, Daniele Mariath Bassuino, Gregory Duarte Juffo, Gisele Silva Boos, Fabiana Marques Boabaid, Nadia Aline Bobbi Antoniassi & David Driemeier

### ABSTRACT

**Background:** Chondrodysplasia is a congenital anomaly related to defects of the genes that control the chondrogenesis. This anomaly is described in many breeds of cattle and consanguineous matings increases the likelihood of developing defective traits. There are three distinct syndromes known: Dexter, Telemark and Brachycephalic type. The chondrodysplasia Dexter type syndrome is associated to an incompletely dominant gene, which occurs in Dexter and Holstein breeds more frequently, yet Charolais and Jersey can also be affected. There are three recognized phenotypes in this form of disease: severe achondroplasia, with abortion before the seventh month of gestation (monster Dexter), when related to dominant homozygous; chondrodysplasia with limbs shortening, when heterozygous; and normal animals, when recessive homozygous. The objective of this paper is to describe Dexter chondrodysplasia observed in two bovine fetuses examined by the Setor de Patologia Veterinária from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

**Case:** The necropsy of two aborted bovine calves was performed by the SPV-UFRGS. The Fetus 1 did not have data, neither clinical history. The Fetus 2, a Jersey breed calf, was in the last third of gestation and came from a property with Jersey and mini-Jersey herd. Natural mating was used for reproduction, with only one bull. Macroscopic alterations observed in both fetuses were characterized by shortened limbs, rounded and disproportionate skull, short snout, under-shot jaw, tongue protrusion and abdominal hernia with eventration. In the second fetus was also observed spina bifida and palatoschisis. Microscopically, in both fetuses were observed extensive areas of immature cartilage, chondrocytes of the femur's bone tissue were not organized in recognizable growth plates, the metaphysis was markedly shortened and consisted in short bone trabeculae with occasional cartilage isles. Immunohistochemistry (IHC) to detect bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was negative.

**Discussion:** The macroscopic and microscopic alterations in both fetuses were compatible with chondrodysplasia "monster Dexter" type. Such alterations, associated with dominant homozygotes, are due to defective endochondral ossification with little growth in the length of long bones, meanwhile intramembranous ossification beneath the periosteum keeps growing and contributing to the abnormal volume and growth of the bones. Such difference is clearly observed when the size of the head is compared with the rest of the body. As the skull bones depends basically on intramembranous ossification, they are generally bigger than the rest of the body. The negative result of IHC to BVDV shows that this agent, known as the cause of congenital malformation did not have association with the anomalies observed. According to other researchers, this low frequency of viral agents as responsible for congenital anomalies was observed previously in cattle from the south of Brazil. Although Dexter chondrodysplasia can be considered of occasional occurrence, it can be responsible for considerable damage. As an abnormality with hereditary nature and consanguinity is the main reason to its occurrence, prevention is the main method to be adopted by the producer to avoid bigger losses.

**Keywords:** chondrodysplasia, bovine, consanguinity, Jersey.

**Descritores:** condrodisplasia, bovino, consanguinidade, Jersey.

#### INTRODUÇÃO

Defeitos congênitos são responsáveis por importantes perdas reprodutivas em bovinos, como abortos [2], malformações fenotípicas, deficiências funcionais e subdesenvolvimento [4].

A condrodisplasia está associada a defeitos dos genes que controlam a condrogênese [5], caracterizada por uma desordem cartilaginosa primária, que resulta em distúrbios generalizados no desenvolvimento ósseo. É descrita em várias raças bovinas e apresenta três síndromes com fenótipos distintos: tipo Dexter, Telemark e Braquicefálico [6,7]. No tipo Dexter existe ainda três fenótipos: marcada discondrodisplasia (monster Dexter), em homozigotos dominantes; condrodisplasia com encurtamento dos membros em heterozigotos; e animais normais em homozigotos recessivos [6,7]. O “monster Dexter” é caracterizado por aborto próximo ao 7º mês de gestação, com feto muito menor para a fase gestacional e com anormalidades esqueléticas graves, como membros extremamente curtos e geralmente rotacionados, cabeça arredondada, focinho curto, mandíbula saliente, fenda palatina e protrusão da língua [6].

No Telemark o animal morre em poucos dias após o parto, decorrente de asfixia por paralisia respiratória [6]. As alterações observadas na cabeça são semelhantes às descritas para o tipo Dexter, e os membros são mais curtos do que o normal [1,6]. Já o tipo braquicefálico, os animais podem apresentar cabeça pequena e arredondada, focinho curto, prognatismo e olhos proeminentes e localizados lateralmente [7].

O objetivo deste trabalho é relatar dois casos de condrodisplasia tipo Dexter em fetos bovinos abortados examinados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

#### RELATO DE CASO

Foram encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) dois fetos bovinos abortados. Os fetos foram necropsiados e fragmentos dos órgãos foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%. Também foi coletado o fêmur, que após fixação em formol, foi descalcificado em ácido nítrico 5% por 12 h e processado rotineiramente para preparação de lâminas histológicas, assim como os demais órgãos, e corados com hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson.

Fragmentos de timo e sistema nervoso central foram submetidos ao exame imuno-histoquímico (IHQ) com anticorpo monoclonal anti-Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)<sup>1</sup> na diluição de 1:500

em PBS. A recuperação antigênica foi realizada com protease 0,05% por 15 min a 37°C e as marcações inespecíficas foram reduzidas a partir da aplicação de leite desnatado a 5% por 15 min. O anticorpo primário foi aplicado durante 50 min a 37°C, seguido do anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina<sup>2</sup> por aproximadamente 20 min cada, em temperatura ambiente. Vermelho permanente<sup>3</sup> foi o cromógeno utilizado. Controles positivos foram inseridos simultaneamente com as lâminas testadas. A hematoxilina foi empregada para contracoloração, por aproximadamente 1 min.

O Feto 1 foi encaminhado para o SPV-UFRGS em 1999, sem dados sobre procedência e histórico da propriedade. O Feto 2, necropsiado em 2011, era da raça Jersey e segundo dados obtidos com o veterinário responsável, estava no último terço gestacional e provinha de uma propriedade do município de Viamão, Rio Grande do Sul. O rebanho é formado por bovinos da raça Jersey e mini-Jersey, criados sem fins lucrativos e a reprodução é realizada por monta natural com apenas um touro. No mesmo período houve relatos de outros abortos na propriedade, inclusive alguns com malformações, no entanto, esses não foram encaminhados para exame.

As alterações macroscópicas observadas nos dois fetos foram semelhantes e caracterizaram-se por encurtamento dos membros, crânio arredondado e relativamente maior que o corpo, focinho curto, prognatismo inferior e protrusão da língua. Havia também hérnia abdominal com eventração (Figura 1). No Feto 2 foram observadas ainda, espinha bífida e palatosquise.

No exame histológico foram observadas, em ambos os fetos, extensas áreas de cartilagem imatura; os condrocitos do tecido ósseo do fêmur não estavam organizados em placas de crescimento distintas, a metáfise estava marcadamente curta (Figura 2) e as trabéculas ósseas espessas com ocasionais ilhas cartilaginosas (Figura 3). O exame de IHQ para detecção de BVDV foi negativo.



**Figura 1.** Condrodisplasia tipo Dexter. Feto bovino com encurtamento dos membros, hérnia abdominal com eventração, crânio arredondado e relativamente maior que o corpo, focinho curto e prognatismo inferior.

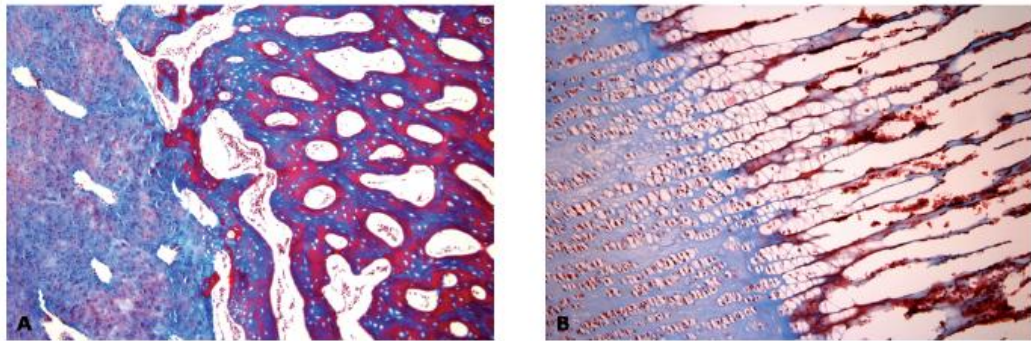


Figura 2. A)- Condrodisplasia tipo Dexter. Tecido ósseo do fêmur. Condrócitos não organizados em placas de crescimento distintas e metáfise marcadamente curta. B)- Feto controle. Tecido ósseo do fêmur com crescimento endocondral normal. Coloração de Tricrômico de Masson [Obj. 40x].

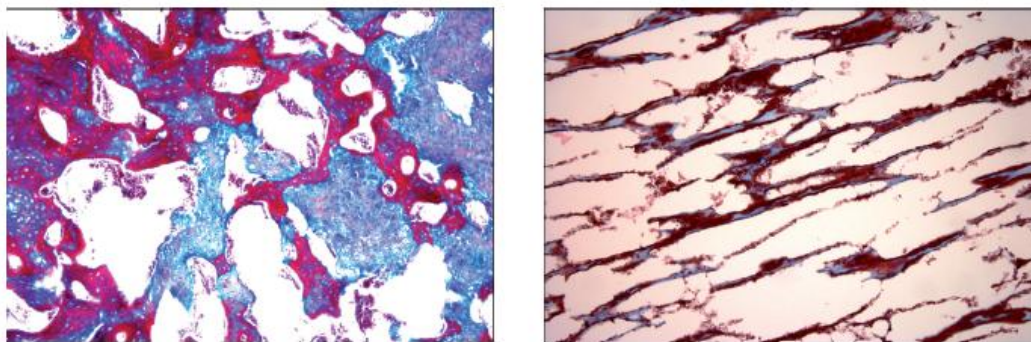


Figura 3. A)- Condrodisplasia tipo Dexter. Tecido ósseo do fêmur. Trabéculas ósseas espessas com ocasionais ilhas cartilaginosas. B)- Feto controle. Tecido ósseo do fêmur com trabéculas ósseas normais. Coloração de Tricrômico de Masson [Obj. 40x].

#### DISCUSSÃO

As alterações macroscópicas e histológicas observadas nos dois fetos analisados foram compatíveis com condrodisplasia do tipo “monster Dexter”, como descrito anteriormente por outros autores [6,7]. No entanto, não apresentaram distorções da coluna vertebral, como cifose, lordose ou escoliose [5]. Contudo, no Feto 2 foi observada espinha bífida.

As alterações macroscópicas observadas são decorrentes de ossificação endocondral deficiente, com pouco crescimento no comprimento dos ossos longos. Nesses casos as placas de crescimento não se apresentam distintas, em vez disso, os condrócitos estão distribuídos na cartilagem fisária sem arranjo definido. A metáfise é curta e as trabéculas ósseas espessas, com eventuais ilhas de cartilagem, enquanto a ossificação intramembranosa sob o perióstio continua normalmente e contribui para o crescimento e volume desproporcional dos ossos [7]. Tal diferença é claramente observada quando o tamanho da cabeça é comparado com o restante do corpo. Como os ossos do crânio dependem basicamente da ossificação intramembranosa, ele se apresenta geralmente bem maior que o restante do corpo [8].

O resultado negativo da IHQ para BVDV demonstra que este agente, conhecido como causa de malfomções congênicas, não teve associação com as anomalias observadas. De acordo com as observações relatadas anteriormente por outros autores [3], também foi observada baixa frequência de agentes virais como responsáveis por anomalias congênicas que levam a abortos em bovinos no Sul do Brasil.

O abortamento do Feto 2 no terço final de gestação é uma característica do fenótipo “monster Dexter”, onde o aborto ocorre por volta do sétimo mês de gestação [6,7] e o que provavelmente ocorreu com o Feto 1. Geralmente, neste tipo de enfermidade as alterações são bastante severas e incompatíveis com a vida.

A condrodisplasia é uma enfermidade associada a um gene de dominância incompleta e o tipo “monster Dexter” tem sido associado à homozigose dominante [6]. Acredita-se que o gene transmissor esteja disseminado na população bovina e que os cruzamentos consanguíneos, muito comuns em pequenas propriedades que utilizam um único reprodutor, levam a um aumento na ocorrência da doença [1,6], fato observado na propriedade do Feto 2.

Embora a condrodisplasia do tipo Dexter possa ser considerada ocasional, ela pode causar prejuízos consideráveis [1], como no caso do Feto 2 onde vários abortos relacionados a malformações foram observados. A prevenção com introdução de novos reprodutores e aumento da diversidade genética no rebanho é o principal método a ser adotado pelo produtor para evitar maiores perdas.

#### NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>Clone 15C5, Syracuse, NY, USA.

<sup>2</sup>LSAB System AP, Dako, CA, USA.

<sup>3</sup>Permanent red/code 0695, Dako, CA, USA.

*Declaration of interest.* The authors report no conflicts of interest. The authors alone are Responsible for the content and writing of the paper.

#### REFERÊNCIAS

- 1 Marcolongo-Pereira C., Schild A.L., Soares M.P., Vargas Jr. S.F. & Riet-Correa F. 2010. Defeitos congênitos diagnosticados em ruminantes na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(10): 816-826.
- 2 McLaren P.J., Gave J.G., Parker E.M. & Slocombe R.F. 2007. Chondrodysplastic Calves in Northeast Victoria. *Veterinary Pathology*. 44(3): 342-354.
- 3 Pavarini S.P., Sonne L., Antoniassi N.A.B., Santos A.S., Pescador C.A., Corbellini L.G. & Driemeier D. 2008. Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28: 149-154.
- 4 Pimentel L.A., Riet Correa F., Gardner D., Panter K.E., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T., Mota R. A. & Araújo J.A.S. 2007. *Mimosa tenuiflora* as a cause of malformations in ruminants in the Northeastern Brazilian semiarid rangelands. *Veterinary Pathology*. 44(6): 928-931.
- 5 Serakides R. 2010. Ossos e articulações. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds). *Patologia Veterinária*. São Paulo: Ed. Rocca, pp.652-654.
- 6 Schild A.L. 2007. Condrodisplasia. In: Riet-Correa F., Schild A. L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3.ed. vol.1. Santa Maria: Palotti, pp.32-34.
- 7 Thompson K. 2007. Bones and joints. In: Maxie M.G. (Ed). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th edn. vol.1. Philadelphia: Saunders Elsevier, pp.25-29.
- 8 Weisbrode S.E. 2009. Ossos e articulações. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds) *Bases da Patologia em Veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.1041-1105.

## 7. CONCLUSÕES

O estabelecimento do diagnóstico etiológico para o aborto através da análise fetal é um trabalho árduo e foi obtido em apenas 46,7 % dos casos estudados.

*Neospora caninum* é o principal responsável por abortos bovinos no Brasil, especialmente em rebanhos leiteiros. O agente foi responsável por 32,6% dos abortos estudados no período de 2003 a 2011 no SPV-UFRGS.

*Brucella abortus* é uma importante causa de aborto em bovinos e foi diagnosticado em 1,92% dos fetos analisados no período de 2001 a 2009 no SPV-UFRGS.

O diagnóstico de aborto por *Brucella abortus* pode ser realizado por diferentes técnicas. O exame imuno-histoquímico e de PCR podem possibilitar identificação de *B. abortus* em casos onde amostras de tecidos de fetos bovinos não são disponíveis para cultivo, principalmente em tecidos placentários, onde a concentração de organismos é maior. Porém as alterações histológicas tanto no feto quanto na placenta associadas à detecção do agente (IHQ, isolamento ou PCR) são imprescindíveis para a realização do diagnóstico de aborto brucélico.

*Geotrichum candidum* deve ser considerado como possível causador de aborto em bovinos, especialmente associado a lesões de pele e pulmonares no feto.

Malformações multissistêmicas podem ser observadas em fetos bovinos abortados, são de ocorrência esporádica e podem estar associadas a fatores genéticos.

Condrodisplasia tipo Dexter é responsável por abortos no ultimo terço de gestação em bovinos da raça Jersey no Estado do Rio Grande do Sul e provavelmente esteja associado a cruzamentos consangüíneos.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson M.L., Andrianarivo A.G. & Conrad P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Rep. Sci.* 60-61:417-431.
- Anderson M.L., Blanchard P.C., Barr B.C. & Hoffman R.L. 1990. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:283-287.
- Corbellini I.G., Driemeier D., Cruz C.E.F., Gondim L.F.P. & Wald V. 2002. *Neospora caninum* as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 103:195-202.
- Corbellini L.G., Pescador C.A., Frantz F., Wunder E., Steffen D.J., Smith D.R. & Driemeier D. 2006. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in southern Brazil. *Vet. J.* 172(1):114-120.
- Dubey J.P. 2003. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89:542-556
- Fernandes C.G. 1998. Doenças da reprodução. In: Riet-correa F., Schild A.L. & Mendez M.D.C. (Eds.). Doença de ruminantes e eqüinos. Pelotas: Ed. Universitária/UFPEL, 651p.
- Kirkbride C.A. 1992. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(2):175-180.
- Larson B.L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. *Vet. Med.*, v.81, p.478-486, 1996.
- Thurmond M.C. & Picanso J.P. 1990. A surveillance system for bovine abortion. *Prev. Vet. Med.* 8:41-53.