

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal



Universidade de Cuiabá

ROBSON DE SOUZA RODRIGUES

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*N. CANINUM* EM
FÊMEAS E FETOS DA ESPÉCIE BOVINA DO MUNICÍPIO DE
NOSSA SENHORA DO LIVRAMENTO – MT.**

Cuiabá, 2013

ROBSON DE SOUZA RODRIGUES

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*N. CANINUM* EM
FÊMEAS E FETOS DA ESPÉCIE BOVINA DO MUNICÍPIO DE
NOSSA SENHORA DO LIVRAMENTO – MT.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Diniz dos Santos

Cuiabá, 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R696p

Rodrigues, Robson de Souza

Pesquisa de anticorpos Anti-*n. Caninum* em fêmeas e fetos da espécie bovina do município de Nossa Senhora do Livramento – MT. / Robson de Souza Rodrigues. – Cuiabá, 2013.

58 f. : il.

Dissertação apresentada à Universidade de Cuiabá, para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Diniz dos Santos

1. Veterinária. 2. Doença Animal. 3. Bovino. 4. Neosporose. 5. *Neospora caninum*. I. Título. II. Universidade de Cuiabá.

CDD 636.2

ROBSON DE SOUZA RODRIGUES

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*N. CANINUM* EM
FÊMEAS E FETOS DA ESPÉCIE BOVINA DO MUNICÍPIO DE
NOSSA SENHORA DO LIVRAMENTO – MT.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
Orientador Prof. Dr. Marcelo Diniz dos Santos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Diniz dos Santos-UNIC

Profa. Dra. Michelle Igarashi-UNIC

Profa. Dra. Lisiane Pereira de Jesus-UFMT

Cuiabá, ____ de _____ de 2013.

Conceito Final: _____

Aos meus pais, Clarice e Milton, esposa Izabella e filho Kevin sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram possível a realização deste trabalho. Desde os trabalhadores do frigorífico, pela participação e pela confiança depositada em nosso trabalho. Profissionais e secretaria do programa de Pós-graduação em Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC.

Aos professores Marcelo Diniz dos Santos e Michelle Igarashi, pelo exemplo de profissionalismo e competência e pelo grande apoio e amizade desenvolvido ao longo desses anos.

A professora e técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UNIC pela ajuda no processamento das amostras

A técnica do laboratório de parasitologia pela ajuda nas montagens das lâminas

Finalizado a todos da minha família por apoiar e acreditar que esse trabalho seria possível ser realizado.

RESUMO

RODRIGUES, R. S. **Pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas e fetos da espécie bovina do município de Nossa Senhora do Livramento – MT.** 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2013.

A Neosporose, doença emergente que tem como agente etiológico o *Neospora caninum*, pode causar abortos e morte neonatal em bovinos, acarretando perdas econômicas em todo o mundo. No Brasil, são frequentes casos de abortos em animais domésticos sem um diagnóstico definitivo. Existem poucas informações sobre a real situação epidemiológica dessa doença no Estado de Mato Grosso, que é detentor do maior rebanho bovino do País. Com o objetivo de avaliar a soroprevalência de neosporose em fêmeas e fetos da espécie bovina e a transmissão vertical de *N. caninum* nesses animais, oriundos do município de Nossa Senhora do Livramento, abatidos em uma unidade frigorífica do município de Várzea Grande – MT, foram coletadas amostras de sangue de 489 fêmeas na linha de abate e de 128 fetos acima de três meses de gestação, obtidos durante a evisceração das referidas fêmeas. A pesquisa de anticorpos anti *N. caninum* nas fêmeas e fetos bovinos foi determinada pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Obteve-se neste estudo 2,45% (12) de fêmeas soropositivas e 3,91% (5) de fetos soropositivos para *N. caninum*. Esse estudo demonstra a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em fetos, confirmando a participação do parasito na transmissão vertical em bovinos do município de Nossa Senhora do Livramento (MT), podendo ser uma das causas de aborto em fêmeas bovinas do referido município.

Palavras-chave: Bovinos de corte. Imunofluorescência. Neosporose. Frigorífico. Transmissão vertical.

ABSTRACT

RODRIGUES, R. S. **Survey of anti-*N. caninum* in females and bovine fetuses in the municipality of Nossa Senhora do Livramento -MT.** 2013. 58 f. Dissertation (MSc Animal Bioscience) - University of Cuiabá, Cuiabá, 2013.

Neosporosis, is an emerging disease which the etiologic agent is the *Neospora caninum*, it can cause miscarriages and stillbirth in cattle, leading to economic losses worldwide. In Brazil, there are frequent cases of abortions in domestic animals without a definite diagnosis. There is little information about the actual situation epidemiology of this disease in the State of Mato Grosso, state that holds the largest cattle herd in the country. With the objective of evaluating the seroprevalence of neosporosis in female and fetuses bovine and vertical transmission of *N. caninum* in these animals, of the municipality of Nossa Senhora do Livramento – MT, from cattle slaughtered in a local slaughterhouse in the municipality of Varzea Grande- MT, we collected blood samples of 489 females on the slaughter line and 128 fetuses above three months of gestation, obtained during evisceration of those females. The detection of anti *N. caninum* in dams and fetuses was determined by the technique of Indirect Immunofluorescence (IFAT). We obtained in this study 2.45% (12) of seropositive and 3.91% (5) seropositive to *N. caninum*. This study demonstrates the presence of anti-*N. caninum* in fetuses, confirming the participation of the parasite in vertical transmission in cattle in the municipality of Nossa Senhora do Livramento (MT) and it can be a cause of females abortion from this municipality.

Keywords: Beef cattle. Immunofluorescence. Neosporosis. slaughterhouse. Transmission. Vertical.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição das coletas de sangue, número de fêmeas e fetos coletados e de soropositivos para *Neospora caninum* obtidos durante o abate realizado no período de maio a setembro de 2012, no frigorífico de Varzea Grande - MT (SISE 16)55
- Tabela 2 - Análise estatística da distribuição amostral das fêmeas abatidas no frigorífico de Varzea Grande - MT (SISE 16), no período de maio a setembro de 2012, com relação ao estudo realizado para identificar anticorpos anti-*N. caninum*.....56

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de diferentes Estados brasileiros, respectivas técnicas e autores21
- Quadro 2 - Achados histopatológicos dos casos de aborto bovino que continham lesões compatíveis com infecção por *Neospora caninum*.....27
- Quadro 3 - Exames sorológicos utilizados no diagnóstico de *N. caninum*32
- Quadro 4 - Diagnóstico diferencial de neosporose em cães34

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Oocisto de <i>Neospora caninum</i> . (A) Oocisto não esporulado (B) Oocisto esporulado, contendo dois esporocistos (seta), cada um com quatro esporozoítas.....	16
Figura 2 - Diversas formas de taquizoítos. (a) Taquizoíto fino. (b) Taquizoitos antes da divisão. (c) Três taquizoítos em divisão em comparação ao tamanho da hemácia (seta).....	17
Figura 3 - (A) Cisto <i>N. caninum</i> , setas indicam espessura da parede, (B) Cisto de <i>T. gondii</i>	17
Figura 4 - Ciclo biológico de <i>N. caninum</i>	19
Figura 5 - (A) <i>N. caninum</i> e (B) <i>Hammondia spp.</i> Seta vermelha = oocisto esporulado, Seta azul = oocisto não esporulado.....	29
Figura 6 - Bradizoíto de <i>N. caninum</i> no cérebro (Histologia)	30
Figura 7 - Cérebro de feto bovino onde cepa de <i>Neospora caninum</i> foi isolada	31
Figura 8 - Cisto tecidual de neosporose (Imunohistoquímica)	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	HISTÓRICO.....	14
2.2	ETIOLOGIA	16
2.3	CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO	18
2.4	EPIDEMIOLOGIA	20
2.5	ASPECTOS CLÍNICOS E ACHADOS DE NECROPSIA	25
2.6	DIAGNÓSTICO.....	27
2.6.1	Diagnóstico clínico	28
2.6.2	Diagnóstico direto	28
2.6.2.1	Método de Diagnóstico Coproparasitológico	28
2.6.2.2	Método Histológico	29
2.6.2.3	Método de PCR (Reação em cadeia pela polimerase).....	30
2.6.2.4	Isolamento e Inoculação em Animais de Laboratórios	30
2.6.3	Diagnóstico Indireto	31
2.6.3.1	Métodos de Diagnóstico Sorológico	31
2.6.3.2	Método Imunohistoquímica.....	32
2.6.4	Diagnóstico Diferencial	33
2.7	TRATAMENTO	34
2.8	PREVENÇÃO E CONTROLE	35
	REFERÊNCIAS	38
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	ARTIGO	48
	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-N. CANINUM EM FÊMEAS E FETOS DA ESPÉCIE BOVINA DO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO LIVRAMENTO – MT	49
	RESUMO.....	49
	ABSTRACT	50
	INTRODUÇÃO.....	50
	MATERIAL E MÉTODOS	52
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório, tem sua característica morfológica semelhante a do *Toxoplasma gondii*. Cães domésticos, Dingo Australiano e o coiote (*Canis latrans*) são as espécies que podem atuar como hospedeiro definitivo. Já os bovinos, ovinos, equinos, caprinos e veados e outros mamíferos são considerados hospedeiros intermediários (DUBEY; SCHARES, 2011). A transmissão vertical (transplacentária) é a principal forma de disseminação de *N. caninum* em rebanhos bovinos (DUBEY, 2003). Em cães e pela ingestão de carne contendo os cistos de *N. caninum*, em função do seu hábito carnívoro (DUBEY; SCHARES, 2011).

A detecção da presença ou possível contato com *N. caninum* pode ser realizado por meio de testes sorológicos para a detecção de anticorpos, como ELISA (Ensaio imunoenzimático) e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) (INNES et al., 2002). A RIFI é considerada uma técnica específica, pois possui pouca ou quase nenhuma reatividade cruzada com outros coccídeos (YAMANE et al., 1993).

As perdas econômicas em gado leiteiro e de corte, chegaram a 35 milhões de dólares por ano na Califórnia e na Austrália a 85 milhões/ano para a indústria leiteira e 25 milhões de dólares para a produção de carne/ano (ANDERSON; ADRIANARIVO; CONRAD, 2000).

Existem muitas causas de perdas fetais e de recém nascidos no rebanho bovino, resultando em prejuízos econômicos significativos. A identificação dessas causas é de fundamental importância para se determinar as devidas medidas de prevenção e controle e assim poder identificar o quanto a mesma afeta a rentabilidade do sistema de cria na cadeia produtiva (ANDREOTTI et al., 2005).

Até a descoberta do *N. caninum* por Dubey em 1988, muitos abortos bovinos permaneceram sem diagnóstico por não estarem associados a outras causas reprodutivas até então conhecidas (NETA; JUNIOR, 2006).

O aborto em bovinos ocorre nos diversos estágios gestacionais e possui diversas causas, de modo que é fundamental o seu diagnóstico. As causas principais são brucelose, leptospirose, campilobacteriose, complexo herpes vírus, tricomonose, diarreia viral bovina, intoxicações, nutricionais, de manejo e outras desconhecidas. Definir o diagnóstico da causa do aborto é essencial para determinar o destino da matriz e as medidas profiláticas aplicáveis ao rebanho, caso sejam

necessárias, para a sua prevenção (ANUALPEC, 2013).

Considerando que o Estado de Mato Grosso tem como base econômica o seu potencial agropecuário, sendo detentor do maior rebanho bovino do País, com 28.651.256 cabeças (INSTITUTO..., 2013), além do fato de existirem poucas informações sobre a real situação epidemiológica dessa doença no Estado (BENETTI et al., 2009), este trabalho tem como objetivo avaliar a soroprevalência de neosporose em fêmeas bovinas, oriundas do município de Nossa Senhora do Livramento, bem como, estudar a transmissão vertical em fetos obtidos destas fêmeas, abatidas em uma unidade frigorífica localizada no município de Várzea Grande – MT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

N. caninum é um parasito protozoário apicomplexa que infecta grande variedade de espécies animais, tanto domésticos como silvestres. A doença foi primeiramente observada por Bjerkas, Mohn e Presthus (1984) em cães com encefalomielite e miosite na Noruega.

O'Toole e Jeffrey (1987) e Parish et al. (1987) foram os primeiros a descrever cistos de *N. caninum* em tecidos de bezerros com sintomas neurológicos ao nascimento. Organismos semelhantes foram diagnosticados por Shivaprasad, Ely e Dubey (1989) na placenta de um feto abortado. O diagnóstico definitivo da infecção por *N. caninum* foi realizado por Lindsay e Dubey (1989), os quais através de um teste imunohistoquímico (IHQ) identificaram o parasito em tecidos. Dubey, Leathers e Lindsay (1989) re-examinaram as seções histológicas do estudo de Parish et al. (1987) e confirmaram através da IHQ, a infecção por neospora.

Thilsted e Dubey (1989) relataram abortos associados a neosporose em um rebanho bovino por IHQ em tecido cerebral dos fetos. Anderson et al. (1991) e Barr et al. (1991) demonstraram, também por IHQ em tecidos fetais, que *N. caninum* foi a principal causa de abortos em rebanhos bovinos leiteiros em regiões dos Estados Unidos.

Somente em 1998, McAllister et al. (1998) identificaram os cães (*Canis familiaris*) como hospedeiros definitivos do parasito ao encontrarem oocistos nas fezes de cães alimentados com tecidos de camundongos contendo cistos teciduais de *N. caninum*.

A transmissão horizontal, dos canídeos para bovinos, foi compreendida quando De Marez et al. (1999) demonstraram que bovinos podem ser infectados oralmente com oocistos de *N. caninum*, excretados por cães quando alimentados por placenta de vacas soropositivas para *N. caninum* (DIJKASTRA et al., 2001) ou tecidos de bezerros infectados naturalmente (GONDIM; GAO; MCALLISTER, 2002).

Cães (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999) e coiotes (GONDIM et al., 2004b) são considerados hospedeiros definitivos, pois nesses animais ocorre a fase reprodutiva sexuada do parasito, resultando na eliminação de oocistos nas fezes.

Anticorpos anti-*N. caninum* já foram identificados em canídeos silvestres (CAÑON-FRANCO et al., 2004; GONDIM et al., 2004a), como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), espécie comum no Brasil, raposas (ALMERIA et al., 2002), gambás (*Didelphis marsupialis*) e em capivaras (*Hydrochoeris hydrochoeris*) (YAI et al., 2003).

O primeiro relato da infecção por *N. caninum* em animais silvestres ocorreu em 1994, quando o parasito foi identificado em amostras de tecidos de cervídeo (*Odocoileus hemionus columbianus*) encontrado morto na Califórnia (WOODS et al., 1994). Em 2004, foi confirmado experimentalmente o ciclo de transmissão entre animais silvestres e domésticos, quando cães eliminaram oocistos de *N. caninum* após consumirem cérebro de cervídeos naturalmente infectados, e o parasito oriundo de cervídeo induziu infecção em um bezerro (GONDIM et al., 2004b).

Na América do Sul, evidências de exposição a *N. caninum* foi mencionada em bovinos, cabras, ovelhas, canídeos, gatos, gambás (*Didelphis marsupialis*), búfalos, alpacas e lhamas (MOORE, 2005). No Brasil, poucos estudos sorológicos foram realizados em canídeos selvagens. Dentre as espécies brasileiras testadas, encontraram-se resultados positivos para lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (VITALIANO et al., 2004), graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (CAÑON-FRANCO et al., 2004).

Até o ano de 2007, somente mamíferos haviam sido identificados como hospedeiros naturais de *N. caninum*. Recentemente o parasito foi detectado em galinhas, o que confere uma distribuição ainda mais ampla do protozoário e representa, provavelmente, grande importância epidemiológica, uma vez que galinhas são consumidas no mundo inteiro por diversas espécies animais (COSTA et al., 2008). Foi demonstrada a excreção de oocistos por cães que consumiram ovos de galinha embrionados infectados experimentalmente com *N. caninum*, o que é sugestivo que galinhas devem participar na transmissão do parasito. É provável que outras espécies de aves possam se infectar com o parasito e participar na disseminação da doença (FURUTA et al., 2007).

Em um estudo recente realizado com marsupiais carnívoros (*Sminthopsis crassicaudata*), amplamente distribuídos nas regiões áridas e semi-áridas da Austrália, mesma área geográfica onde estão o dingo australiano (*Canis lupus dingo*), raposas e pastagens de bovinos. Os autores demonstraram que marsupiais podem ser infectados com *N. caninum* a partir de fezes de dingos, confirmando-se

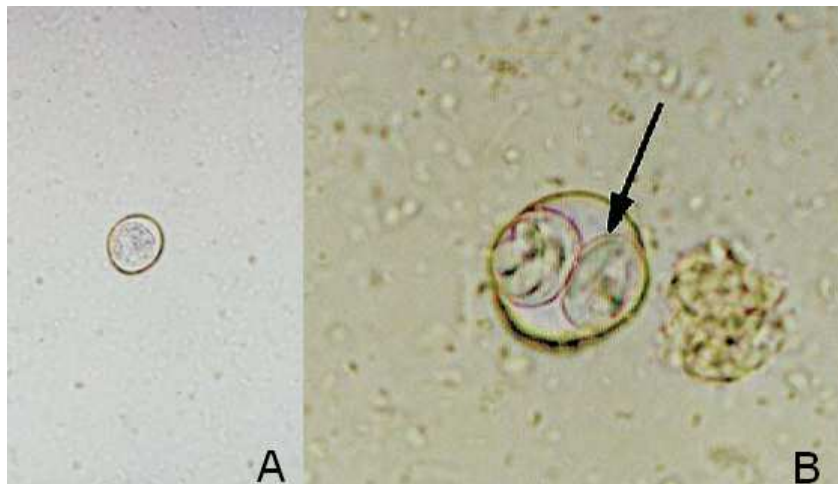
assim o papel do cão australiano como hospedeiro definitivo do parasito junto com o cão doméstico e o coioote (KING et al., 2011).

2.2 ETIOLOGIA

N. caninum pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Sub-classe Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Família Sarcocystidae, Sub-família Toxoplasmatinae, Gênero *Neospora*, Espécie *N. caninum*. Foi identificado em grande parte do mundo como um importante agente causador de aborto (DUBEY; LINDSAY, 1996).

De forma semelhante a outros parasitos formadores de cistos, *N. caninum* possui em seu ciclo de vida um estágio resistente (oocisto contendo esporozoítos), excretado nas fezes dos hospedeiros definitivos. No ambiente, sob condições favoráveis, estes oocistos esporulam, gerando oocistos semelhante aos do *Cystoisospora*, isto é, com dois esporocistos (Figura 1), contendo cada um quatro esporozoítos tornando-se, assim, infectante para os hospedeiros intermediários (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002).

Figura 1 - Oocisto de *Neospora caninum*. (A) Oocisto não esporulado (B) Oocisto esporulado, contendo dois esporocistos (seta), cada um com quatro esporozoítos



Fonte: Andreotti (2003).

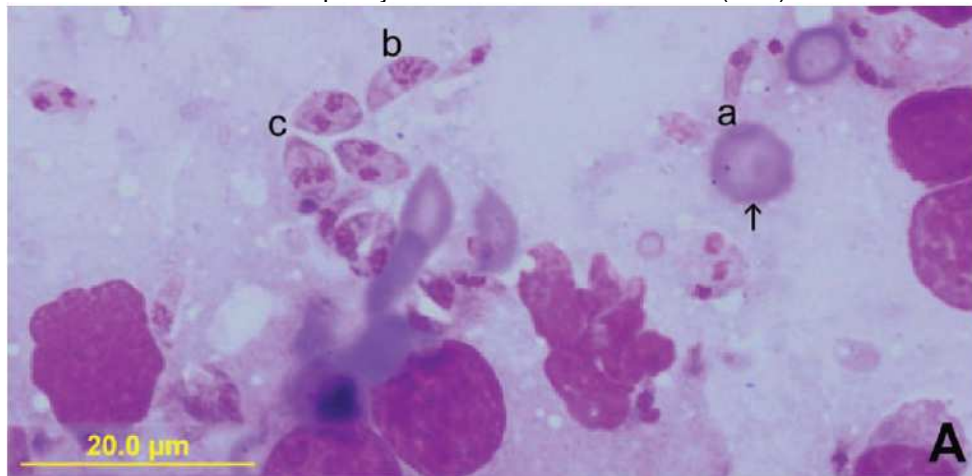
Após a ingestão dos oocistos esporulados em alimentos ou água contaminada, alguns esporozoítos, através da circulação linfática ou sangüínea, atingem os mais diversos órgãos e recebem o nome de taquizoítos (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os taquizoítos tem formato ovóide, lunar ou globular (Figura 2), com

dimensões de 3 a 7 μm de comprimento por 1 a 5 micrometros de largura, conforme o estágio de divisão. Nos animais infectados são encontrados em células do sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio dos túbulos renais e hepatócitos (ROMANELLI; JUNIOR, 2006).

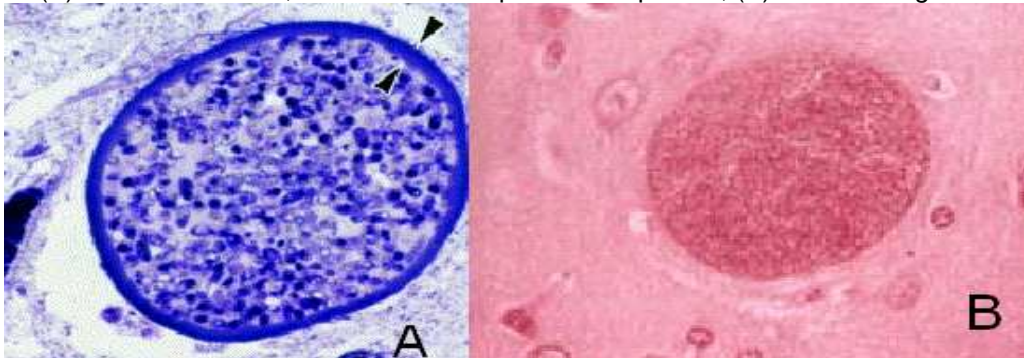
Quando a infecção assume caráter crônico os taquizoítos passam a se chamar bradizoítos, estando normalmente agrupados em cistos teciduais (Figura 3) localizados em musculatura e no sistema nervoso central (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Figura 2 - Diversas formas de taquizoítos. (a) Taquizoíto fino. (b) Taquizoitos antes da divisão. (c) Três taquizoítos em divisão em comparação ao tamanho da hemácia (seta)



Fonte: Dubey et al. (2007).

Figura 3 - (A) Cisto *N. caninum*, setas indicam espessura da parede, (B) Cisto de *T. gondii*



Fonte: <http://www.lookfordiagnosis.com/images.php?term=Neospora&lang=1&from2=24>
<http://www.parasitologia.com.br/2010/11/protozooses.html>

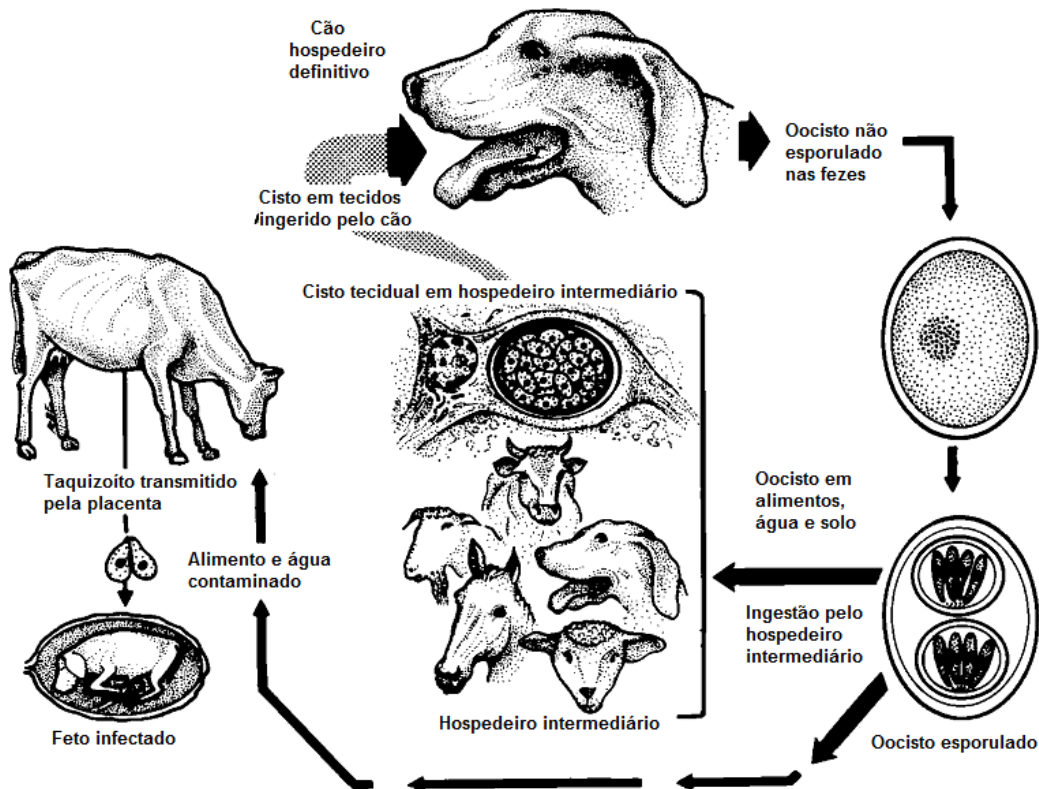
Os bradizoítos no interior dos cistos teciduais são as formas de proteção contra reações imunológicas e fisiológicas do hospedeiro. Os cistos têm forma arredondada, sua parede é lisa apresentando ramificações e sua espessura depende do tempo de infecção. Os taquizoítos são ovóides, possuem três organelas secretoras diferentes que participam da invasão, formação e manutenção do vacúolo

parasitóforo, o que permite a sobrevivência e proliferação do parasito (FERREIRA, 2000).

2.3 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório, e seu ciclo evolutivo apresenta três estágios identificados: taquizoitos, que são as formas de multiplicação rápida, produzem várias centenas de novos parasitos em poucos dias, causando lesões e ruptura celular; bradizoitos, forma de multiplicação lenta, são capazes de formar cistos intracelulares nos tecidos do sistema nervoso central, ocorre tanto no hospedeiro definitivo quanto no intermediário, podendo persistir nestes por vários anos sem causar manifestação clínica significativa e os oocistos que são eliminados pelas fezes de hospedeiros definitivos (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Nos hospedeiros definitivos após a ingestão desses cistos teciduais, ocorre o desenvolvimento sexual do protozoário, eliminando oocistos nas fezes, estes são esféricos ou subesféricos e medem de 10 a 11 micrômetros de diâmetro. Esporulam em 24 horas, em temperatura ambiente, resultando em dois esporocistos com quatro esporozoítos. Ao serem ingeridos pelos hospedeiros intermediários, ocorre a liberação dos esporozoítos na luz intestinal, estes penetram na parede do intestino passando a se denominar taquizoítos (Figura 4) (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999).

Figura 4 - Ciclo biológico de *N. caninum*

Fonte: Adaptado de Dubey (2003)

Os dois mecanismos de infecção conhecidos de *N. caninum* são a transmissão horizontal ou infecção pós-natal quando a infecção ocorre por ingestão de água ou alimentos contaminados e a transmissão vertical ou infecção congênita, que ocorre quando a mãe transmite a doença para seus descendentes via transplacentária. A transmissão vertical (transplacentária) é a principal forma de disseminação do *N. caninum* em rebanhos bovinos, mantendo a infecção por várias gerações (BASSO et al., 2001).

Nos bovinos a única forma de transmissão horizontal, em ambiente natural, é através da ingestão de oocistos esporulados de *N. caninum* em alimentos ou água contaminados (GONDIM et al., 2004b). Nos animais que tenham tido contato oral com oocistos esporulados, estes rompem-se pela ação mecânica liberando os esporozoítos na luz intestinal. Estas estruturas penetram nas células intestinais e sofrem multiplicação assexuada originando taquizoítos, que podem atingir várias células do hospedeiro intermediário causando diversas lesões. Alguns desses taquizoítos se transformam em bradizoítos no interior dos cistos e podem permanecer em latência por vários anos (DUBEY, 1999).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Os estudos de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum*, indicam que a neosporose apresenta ampla distribuição mundial. Os cães e bovinos são as principais espécies expostas ao parasito (ANDERSON; ADRIANARIVO; CONRAD, 2000).

Na Califórnia, a doença é considerada a mais importante causa de aborto no rebanho leiteiro. O custo associado aos abortos por *N. caninum* na indústria leiteira da Califórnia foi estimado em 35 milhões de dólares, na Nova Zelândia em 24 milhões de dólares, e na Austrália 85 milhões de dólares na indústria leiteira e 25 milhões na indústria de carne (WALKER, 2004).

O primeiro estudo de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos de leite realizado no sul da China, reportou taxa média de 18,9% e de 22,7% para vacas com histórico de aborto, demonstrando que a infecção por *N. caninum* é prevalente no rebanho bovino leiteiro do sul da China, sendo uma das causas de aborto naquele país (XIA et al., 2011).

A infecção por *N. caninum* em bovinos tem sido reconhecida em todo mundo e é atualmente aceita como importante causa de abortos em bovinos de corte e leite, encontrada em países como o México (ABBIT et al., 1993), Dinamarca (AGERHOLM; BARR, 1994), Reino Unido (OTTER et al., 1995), Suécia (HOLMDAHL et al., 1995), Irlanda (McNAMEE; JEFFREY, 1994), Estados Unidos da América, Holanda e Nova Zelândia (MCALLISTER et al., 1996; McALLISTER et al., 1998). Além disso, registros da doença são citados na Hungria (HORNOK et al., 1998), na Argentina (CAMPERO et al., 1998), no Canadá (PARÉ et al., 1998), no Vietnã (HUONG et al. 1998), na Suíça (GOTTSTEIN et al., 1999) e na Espanha (GONZALES et al., 1999).

A neosporose bovina está amplamente disseminada na Europa, África do Sul, Ásia, Austrália e nas Américas. Moore et al. (2002) observaram na Argentina, prevalência de 16,6% de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas leiteiras em relação as de corte (4,7%), avaliadas em rebanho sem histórico de perdas reprodutivas. Oshiro et al. (2007) sugerem que possivelmente a maior prevalência observada seja em função de que a média de vida do gado leiteiro é geralmente maior do que a de bovinos de corte, aumentando as probabilidades de exposição às fontes de infecção.

O Quadro 1 apresenta os resultados de pesquisa sorológica de anticorpos anti - *N. caninum*, realizadas em bovinos, em diferentes estados do Brasil, indicando

que o agente está disseminado pelo país, com ocorrência em bovinos de corte e leite, com prevalência de animais soropositivos variando de 6,8 a 67,8% (GENNARI, 2004; GENNARI, 2005). Vale ressaltar que os diversos estudos realizados para determinar a prevalência sorológica de *N. caninum* mostram diferenças consideráveis entre os países, dentro dos países, entre regiões, e entre bovinos de corte e de leite. Portanto, deve-se ter cuidado ao avaliar estes resultados, em função de diferenças nas técnicas sorológicas, desenho do estudo e tamanho da amostra utilizada (DUBEY et al., 2007).

Quadro 1 - Prevalência de anticorpos anti-Neospora caninum em bovinos de diferentes Estados brasileiros, respectivas técnicas e autores

Autor	Estado	Amostra (Nº)	Prevalência (%)	Tecnica
Gondim et al. (1999a)	BA	447	14,1	RIFI
Jesus et al. (2006)	BA	391	10,3	RIFI
Santos et al. (2010)	BA	100	20,0	PCR
Andreotti et al. (2002)	GO	441	17,4	ELISA
Melo et al. (2006)	GO	283	30,4	RIFI
Teixeira et al. (2010)	MA	812	34,7	RIFI
Melo e Leite (1999)	MG	39	7,7	ELISA
Melo (2001a)	MG	584	18,7	ELISA
Costa et al. (2001)	MG	88	6,8	RIFI
Ragozo et al. (2003)	MG	162	29,0	RIFI
Brautigam et al. (1996)	MS	50	8,0	ELISA
Andreotti et al. (1999)	MS	91	7,7	ELISA
Andreotti et al. (2003)	MS	151	16,6	ELISA
Ragozo et al. (2003)	MS	110	28,2	RIFI
Mello et al. (2008)	MS	392	9,7	RIFI
Benetti et al. (2009)	MT	928	53,5	RIFI
Silva et al. (2002)	PE	469	34,7	RIFI
Ogawa et al. (2000)	PR	385	11,7	RIFI
Locatelli-Dittrich et al. (2001a)	PR	147	42,0	ELISA
Locatelli-Dittrich et al. (2001b)	PR	172	34,8	ELISA
Ragozo et al. (2003)	PR	90	22,2	RIFI
Guimaraes Junior et al. (2004)	PR	623	21,5	RIFI
Marques et al. (2011)	PR	159	15,1	ELISA
Munhoz et al. (2002a)	RJ	140	33,6	ELISA
Munhoz et al. (2002b)	RJ	126	23,8	ELISA
Ragozo et al. (2003)	RJ	150	14,7	RIFI

Cont. Quadro 1 - Prevalência de anticorpos anti-Neospora caninum em bovinos de diferentes Estados brasileiros, respectivas técnicas e autores

Autor	Estado	Amostra (N0)	Prevalência (%)	Tecnica
Munhoz et al. (2009c)	RJ	286	50,8	ELISA
Aguiar (2004)	RO	2109	8,7	RIFI
Corbellini et al. (2002)	RS	223	11,2	RIFI
Ragozo et al. (2003)	RS	140	20,0	RIFI
Cobellini et al. (2003)	SC	29	65,5	ELISA
Brautigam et al. (1996)	SP	40	15,0	ELISA
Pituco et al. (2001)	SP	50	8,0	ELISA
Belo et al. (1999)	SP	28	67,8	RIFI
Sartor et al (1999)	SP	521	16,3 30,1	RIFI ELISA
Stobbe et al. (1999)	SP	84	36,7	RIFI
Hasegawa (2000)	SP	777	15,5	RIFI
Costa et al. (2001)	SP	411	23,1	RIFI
Andreotti et al. (2002)	SP	12	41,6	ELISA
Ragozo et al. (2003)	SP	150	23,6	ELISA
Sartor et al. (2005)	SP	505 408	20,0 35,5	ELISA ELISA

No Brasil, no Estado da Bahia, Gondim et al. (1999a) realizaram o primeiro estudo de soroprevalência do *N. caninum* em bovinos, ao examinarem soro sangüíneo de 447 vacas da raça Holandesa e mestiças, em 14 propriedades leiteiras do estado, sendo 80% dos animais constituído por vacas em lactação. Para o teste foi utilizado a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CONRAD et al., 1993; YAMANE et al., 1997), com uma titulação de 200 sendo considerado positivo para anticorpos de *N. caninum*. Anticorpos foram detectados em 63 (14,09%) dos 447 soros testados. Somente uma das 14 propriedades leiteiras não apresentou evidência sorológica de neosporose.

No Rio Grande do Sul, vacas com histórico de aborto apresentaram soropositividade de 23% para *N. caninum*, enquanto que vacas sem histórico de aborto apresentaram somente 8,3%. Além disso, o protozoário foi detectado em 81,8% dos fetos examinados por imunohistoquímica (CORBELLINI et al., 2002).

Em levantamento feito por Ragozo et al. (2003), em seis Estados brasileiros, observou-se a soropositividade média de 23,6% nos rebanhos, com aumento dos

índices nos bovinos com idade superior a 24 meses. Foi observada também maior ocorrência nos bovinos de leite (26,2%) quando comparados com os de corte (19,1%).

A neosporose pode ser observada em uma ampla variedade de animais, sendo sua ocorrência relatada pela presença do parasito ou dos anticorpos Anti-*N. caninum* em bovinos, caprinos, ovinos e caninos. As infecções clínicas e subclínicas de *N. caninum* em cães são importantes epidemiologicamente, pois o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal hospedeiro definitivo podendo eliminar oocistos no meio ambiente, tornando-se um fator de risco para a ocorrência de abortos associados a *N. caninum* em bovinos (PARÉ et al., 1998). Estudos no Canadá, Japão e Holanda têm relatado uma relação positiva entre a neosporose canina e bovina (WOUDA et al., 1999).

Corbellini et al. (2002) avaliaram a associação entre infecção e aborto e identificaram lesões cerebrais, como encefalites em 47% dos fetos e presença do protozoário em 81% através da técnica de imunohistoquímica. Observaram também que a frequência de animais soropositivos foi mais elevada nas vacas que abortaram (23,3%) do que naquelas que não abortaram (8,3%) e encontraram associação significativa entre a soropositividade e o aborto. No Rio Grande do Sul, entre 30 fetos abortados, 20% apresentavam lesões características de neosporose e, destes, 10% tiveram a infecção confirmada pela técnica de imunohistoquímica. Esses fetos foram provenientes, na sua maioria, de rebanhos leiteiros, em regime de confinamento em "free-stall", com média de 100 vacas da raça holandesa por rebanho. Os autores sugeriram, com base nos estudos sorológicos e histopatológicos, que a neosporose é uma importante causa de morte fetal naquele Estado.

Ortega-Mora et al. (2003) e Caetano-da-Silva et al. (2004) detectaram o DNA do parasito no sêmen fresco e congelado de touros naturalmente infectados, sugerindo a possibilidade de transmissão venérea.

Ainda no Brasil, Ogawa (2000) ao analisar 385 amostras de soro de bovinos leiteiros da região norte do estado do Paraná pela RIFI observou um percentual de 11,69% de soropositividade para o *N. caninum*, não ocorrendo reação cruzada com o *T. gondii*. Guimarães Junior et al. (2004) estudaram fatores de risco para infecção por *N. caninum* em bovinos em nove municípios do norte do Estado do Paraná, em propriedades produtoras de leite tipo B. A idade dos animais foi fator de risco para a

ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* com maior número de bovinos positivos após os 24 meses de idade. No mesmo estudo a presença de cães positivos nas propriedades e a prevalência nos bovinos apresentaram correlação positiva baixa enquanto a produção de silagem e/ou concentrado na propriedade atuou como fator de proteção. Gondim et al. (2002) reproduziram experimentalmente o ciclo de transmissão cão-bezerro, demonstrando que os cães infectados mediante a ingestão de tecidos de bovinos com neosporose crônica eliminavam maior quantidade de oocistos do parasito em suas fezes quando comparados com aqueles infectados com tecidos de camundongos.

Na região Sudoeste do Estado de Mato Grosso, Benetti et al. (2009) analisaram 932 amostras de soros de bovinos leiteiros da raça Holandesa e mestiças, proveniente de 24 propriedades, utilizando-se o método de diagnóstico de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). A frequência de anticorpos anti-*N. caninum* nos bovinos foi de 53,5% (499/932), através dos resultados conclui-se que o *N. caninum* está amplamente distribuído na região estudada, pelo menos um bovino soropositivo/propriedade foi identificado.

A doença difunde-se rapidamente nos rebanhos, devido a transmissão horizontal, onde os cães e, mais recentemente, os coiotes atuam como fonte de infecção. Acredita-se que outros canídeos silvestres sirvam de hospedeiros definitivos (RIET-CORREA et al., 2003), podendo também ocorrer transmissão vertical (WALKER, 2004). Sugere-se que os cervos possam ter papel importante na epidemiologia do parasito (GONDIM et al., 2004). Pesquisas realizadas demonstraram que a presença e o número de cães nas propriedades rurais podem funcionar como fatores de risco para a infecção e a ocorrência de abortos em bovinos, indicando uma associação entre a infecção em ambas as espécies (SÁNCHEZ et al., 2003).

Corbellini et al. (2002) relataram a presença de cães em todas as propriedades com histórico de aborto associado ao *N. caninum*, destacando o provável papel desses animais na transmissão horizontal do parasito para bovinos, além de sugerirem, com base em dados obtidos na literatura especializada, o envolvimento de canídeos silvestres no ciclo epidemiológico do agente. Isto se deve ao fato dos animais destas áreas terem maior contato com carne e vísceras infectadas, quando comparados aos cães domiciliados de áreas urbanas (MELO et al., 2005).

Sabe-se que a neosporose em ovinos não apresenta a mesma relevância que em bovinos. No entanto propriedades em que ovinos são criados junto com bovinos, estes podem eventualmente participar da epidemiologia da infecção (FIGLIUOLO et al., 2004).

A prevalência varia de acordo com o país, a região, o tipo de teste sorológico e o ponto de corte usado para determinar a exposição do rebanho ao agente e a relação com a ocorrência de abortos. Por isso, torna-se difícil compará-las. Após o primeiro surto de abortos sabidamente causado pelo agente, seguiram-se inúmeros trabalhos que comprovam a presença do parasito ou, na maioria, de anticorpos para o mesmo, em bovinos de todo o mundo, inclusive do Brasil, avaliando sua possível relação com a ocorrência de abortos. Esses estudos indicam que o agente está disseminado no País, em bovinos de corte e de leite, tendo forte impacto econômico (CORBELLINI et al., 2002).

2.5 ASPECTOS CLÍNICOS E ACHADOS DE NECROPSIA

Quando a infecção ocorre durante o primeiro trimestre da gestação, fase em que o sistema imune fetal ainda está imaturo, ocorre reabsorção fetal ou aborto, em quase todos os casos. A infecção no terço médio da gestação pode levar a aborto, mumificação fetal ou infecção congênita da cria que nascerá com sinais clínicos, na maioria dos casos. Já no terço final, ocorrerá infecção congênita, porém com o nascimento de bezerros clinicamente normais, soropositivos e com infecção persistente. Outros sinais, além do aborto, ocorrem, raramente, em bezerros com menos de dois meses de idade, e geralmente são neurológicos, variando desde leves disfunções até completa paralisia. Os membros anteriores e/ou posteriores podem estar flexionados ou hiperestendidos. Pode ocorrer exoftalmia ou aparência assimétrica dos olhos. Microscopicamente há uma encefalomielite multifocal, sobretudo na porção cinzenta da medula espinhal (DUBEY et al., 1996; DUBEY; SCHARES, 2011)

Nos bovinos adultos, o aborto é o único sinal clínico observado em fêmeas gestantes infectadas (vacas ou novilhas), ocorrendo do 3º ao 9º mês de gestação, principalmente entre 5 e 6 meses. A maior parte dos bovinos adultos consegue controlar a infecção e permanecer clinicamente normal, porém, persistentemente infectado. Entre 5 e 6% desses animais podem abortar novamente em sucessivas

gestações (ANDERSON et al., 1995; WOUUDA et al., 1998). O *N. caninum* é capaz de estabelecer-se no septo caruncular materno e o dano placentário induzido pelo parasito pode comprometer sobrevivência fetal direta ou causar a liberação de prostaglandinas maternas, que por sua vez causam a luteólise e aborto. Dano fetal pode ocorrer devido a dano primário tecidual no feto causado pela multiplicação de *N. caninum* ou devido à insuficiência de oxigênio e nutrição, acarretando dano secundário placentário (GIBNEY et al., 2008).

A variação das manifestações clínicas depende da idade do feto, do estágio de desenvolvimento do sistema imune, tempo de exposição ao parasito e distribuição das lesões no SNC (ANDERSON et al., 1997). Os sintomas nervosos ocorrem devido a destruição de grande número de células dos nervos craniais, espinhais o que afeta a condutividade. Os sintomas podem variar desde incoordenação, ligeira dificuldade para se levantar até paralisia completa e debilidade, miosites e deformidades dos membros podem ocorrer devido a degeneração muscular (FERREIRA, 2000).

A descamação do endotélio vascular associado à trombose das carúnculas maternas pode causar o aborto. Segundo Buxton et al. (1998) citados por Otter et al. (1995), a causa do aborto é de difícil determinação, mas necrose difusa e inflamação são achados característicos no coração do feto e na placenta, assim a morte do feto, provavelmente ocorre devido à miocardite.

A freqüência de abortos por *N. caninum* pode ser esporádica, constante durante alguns meses (endêmica) ou em surtos (epidêmica). Os abortos endêmicos ocorrem em rebanhos cronicamente infectados, em torno de 5% do rebanho ao ano. Nos surtos mais de 30% das fêmeas podem abortar em poucos meses (THORNTON et al., 1994). Após os surtos, o rebanho torna-se cronicamente infectado. Nos abortos não foram observados retenção de placenta (ANDERSON et al., 2000).

A maioria dos bezerros infectados intra-uterinamente, ao nascer apresenta altos títulos de anticorpos anti- *N. caninum*. Oitenta a noventa por cento dos filhos das vacas soropositivas são congenitamente infectados (THURMOND et al., 1999), sendo responsáveis pela manutenção da doença no rebanho. É provável que grande número dos bezerros com neosporose clínica venham a óbito nas primeiras quatro semanas de vida (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Bartels et al. (2006) não encontraram associação significativa entre a infecção por *N. caninum* e outros problemas reprodutivos além dos abortos. Alguns estudos

demonstraram que vacas infectadas por *N. caninum* tiveram maior risco de retenção de placenta (BARTELS et al., 1999; HOBSON et al., 2005), contrapondo o relatado por Anderson et al. (2000).

O aparecimento dos sintomas em bezerros nascidos de mães infectadas ocorre cerca de cinco dias após o parto (BARR et al., 1993). Dubey (1989) observou ainda mielite, miocardite e encefalite associado ao *N. caninum*, em bezerros infectados. O *N. caninum* é encontrado na maioria das vezes em cérebro, fígado e coração e raramente em outros órgãos, inclusive a placenta. Wouda et al. (1997) pesquisando o parasito em 80 fetos abortados, encontraram-no em cérebro (71 casos = 89%), fígado (21 casos = 26%) e coração (11 casos = 14%), por meio de imunohistoquímica. Segundo Dubey e Lindsay (1996) não há dados sobre a localização preferencial do *N. caninum* no cérebro, portanto, para exame histológico qualquer parte ou fragmento do cérebro pode ser examinado (Quadro 2).

Quadro 2 - Achados histopatológicos dos casos de aborto bovino que continham lesões compatíveis com infecção por *Neospora caninum*

Caso	Ano	Período (meses)	Órgãos examinados	Lesões encontradas
1	1995	ND	Coração, pulmão, fígado, rim.	Miocardite não supurativa com extensos infiltrados subendocárdicos e áreas de necrose com alguns polimorfonucleares.
2	1996	7,5	Cérebro	Focos inflamatórios multifocais compostos por células mononucleares.
3	1997	ND	Cérebro	Focos inflamatórios multifocais compostos por células mononucleares com necrose central em algumas áreas.
4	1998	6	Cérebro, coração, pulmão, fígado, rim.	Cérebro contendo vários focos inflamatórios multifocais compostos por células mononucleares com necrose central em algumas áreas; miocardite não supurativa acentuada com necrose, calcificação e grupos de taquizoítos; pulmão apresentando discreto infiltrado de células mononucleares intersticial; rim com infiltrados inflamatórios não supurativo intersticial.
5	1998	ND	Coração	Miocardite não supurativa moderada.

Fonte: Dubey e Lindsay (1996).

2.6 DIAGNÓSTICO

No diagnóstico laboratorial, os exames hematológicos e de bioquímica clínica podem auxiliar. Observa-se elevação dos níveis de creatinina, de enzimas hepáticas

e de proteínas totais do líquido. No diagnóstico *pós-mortem*, é necessário o uso de imunohistoquímica para detectar taquizoítos e cistos nos tecidos fixados (DUBEY; LINDSAY, 1996). Várias técnicas podem ser utilizadas para revelar a presença do parasito, como exames histopatológicos e imunohistoquímicos, amplificação dos genes (PCR) e o isolamento dos parasitos mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório. Outra alternativa é o diagnóstico sorológico, através da pesquisa de anticorpos anti- *N. caninum* (ANDREOTTI et al., 2003). Os materiais ideais para o diagnóstico histopatológico são cérebro, coração, fígado, placenta e líquidos corporais, devendo ser usados vários órgãos fetais para um bom diagnóstico. O cérebro apresenta lesões focais, encefalite não supurativa, com variado nível de necrose focal. Lesões também aparecem na placenta, mas os parasitos são difíceis de serem encontrados (GIRALDI et al., 2001).

2.6.1 Diagnóstico clínico

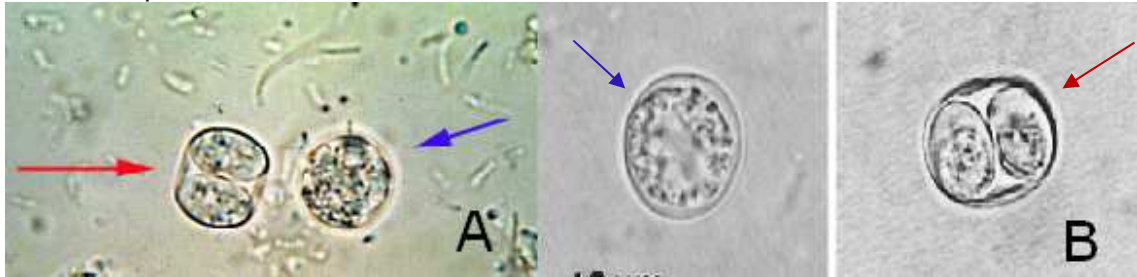
O diagnóstico de bovinos depende de uma combinação entre o histórico do rebanho, sinais clínicos e dados de laboratório. O quadro clínico sugestivo de neosporose é a presença de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. Em bovinos adultos, a ocorrência de abortos e o nascimento de bezerras natimortas são sinais sugestivos de infecção por *N. caninum*. Os casos assintomáticos em bovinos e os sinais inespecíficos da neosporose dificultam o diagnóstico clínico da doença. Conseqüentemente, o diagnóstico laboratorial é imprescindível para confirmar uma infecção por *N. caninum* (ANDREOTTI et al., 2003).

2.6.2 Diagnóstico direto

2.6.2.1 Método de Diagnóstico Coproparasitológico

No exame parasitológico de fezes de cães observaram-se os oocistos. Mas estes devem ser diferenciados de outros gêneros após sua esporulação, principalmente de *Hammondia spp.* (Figura 5) (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Figura 5 - (A) *N. caninum* e (B) *Hammondia spp.* Seta vermelha = oocisto esporulado, Seta azul = oocisto não esporulado



Fonte: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-324R>;
<http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/toxopla.htm>

2.6.2.2 Método Histológico

As técnicas histopatológicas são muito utilizadas no diagnóstico do aborto por *N. caninum*. O feto deve ser enviado ao laboratório, juntamente com a placenta e se possível, com o soro sanguíneo da mãe. Os órgãos de eleição para o diagnóstico são cérebro, coração e fígado. O exame histopatológico do feto é utilizado no diagnóstico de aborto por *N. caninum*. No entanto, mesmo que as lesões no cérebro, coração e fígado sejam sugestivas de neosporose, é necessária a detecção por imunohistoquímica do parasito (ANDREOTTI et al., 2003).

De acordo com Silva (2004), a identificação do parasito, através de técnicas de histopatologia, é difícil, pois as lesões macroscópicas são pouco frequentes e o número de parasitos também é escasso, tornando difícil a sua visualização em cortes histológicos (Figura 6) corados pela hematoxilina-eosina. As lesões mais significativas são caracterizadas por encefalite não supurativa e miocardite.

Figura 6 - Bradizoíto de *N. caninum* no cérebro (Histologia)



Fonte: <http://www.neurolatinvet.com/por/publi/meningomielitis.htm>

2.6.2.3 Método de PCR (Reação em cadeia pela polimerase)

As técnicas de PCR são de grande importância para o diagnóstico de *N. caninum*, pois permitem amplificar quantidades muito pequenas de DNA, mesmo em tecidos que já estejam autolisados, apresentando alta sensibilidade e especificidade. O desenvolvimento das técnicas de PCR quantitativas permitiu tanto a detecção como também a quantificação do DNA do parasito em diferentes tecidos de animais infectados (ANDREOTTI et al., 2003).

Este método de diagnóstico possibilitou a caracterização molecular do parasito *N. caninum* (DUBEY; LINDSAY, 1996). Levou a descoberta de que os isolados de *N. caninum* de cães e de bovinos pertencem à mesma espécie e são geneticamente idênticos (MARSH et al., 1998).

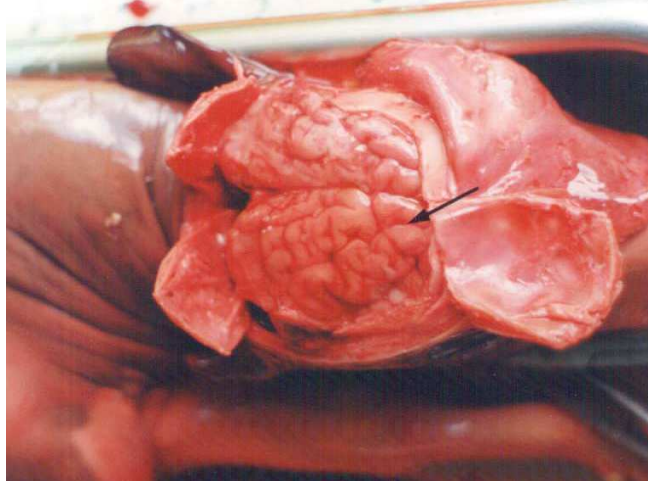
O PCR é altamente sensível e específica para o diagnóstico da neosporose, esta técnica vem sendo utilizada para detectar o DNA de *N. caninum*, tanto em infecções naturais, quanto experimentais (ELLIS et al., 1999). Contudo, a técnica não é rotina devido ao seu custo elevado e aos problemas técnicos associados com a detecção do DNA em cérebros de fetos autolisados (DUBEY, 1999).

2.6.2.4 Isolamento e Inoculação em Animais de Laboratório

Esta técnica é utilizada para a obtenção de cepas (Figura 7), estudos de patogenia e diagnóstico de infecção. O diagnóstico de neosporose pelo isolamento

do parasito, a partir de amostras de tecidos com suspeita de infecção, pode ser realizado por meio da utilização de cultivos celulares (células Vero, Marc, monócitos bovinos) e/ou inoculação em animais sensíveis, imunossuprimidos ou não, a identificação do parasito pode ser confirmada por imunofluorescência direta (IFD) ou PCR (SILVA, 2004).

Figura 7 - Cérebro de feto bovino onde cepa de *Neospora caninum* foi isolada



Fonte: Locatelli-Dittrich (2001b).

2.6.3 Diagnóstico Indireto

2.6.3.1 Métodos de Diagnóstico Sorológico

Existem vários testes que detectam anticorpos séricos específicos para *N. caninum*, principalmente em cães e bovinos (Quadro 3). Os mais utilizados são os testes sorológicos de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e de ensaio imunoenzimático (ELISA) que necessitam do conjugado, anticorpo secundário espécie-específico, para detectar os anticorpos de *N. caninum*. No método da RIFI, os taquizoítas inteiros são fixados nas lâminas. Já nos diferentes tipos de ELISA, são utilizados: o extrato de taquizoítas; os taquizoítas inteiros; os antígenos de taquizoítas incorporados a um complexo imunoestimulante e os antígenos recombinantes (ATKINSON et al., 2000).

Quadro 3 - Exames sorológicos utilizados no diagnóstico de *N. caninum*

Métodos	Antígenos
RIFI	Taquizoítas
Imunoblot	Extrato solúvel
ELISA cinético	Sonicado
ELISA	Extrato solúvel
ELISA	Extrato <i>iscom</i>
CI-ELISA	P65
r-ELISA	NCDGI-2, N54
IFAT-ELISA	Taquizoítas
MAT	Taquizoítas

Fonte: Atkinson et al. (2000).

RIFI = reação de imunofluorescência indireta

ELISA = ensaio imunoenzimático

CI-ELISA = ELISA de competição e inibição

r-ELISA = ELISA recombinante

Iscom = complexo imunoestimulante

IFAT = *Indirect Fluorescent Antibody Test*

MAT = teste de aglutinação modificada

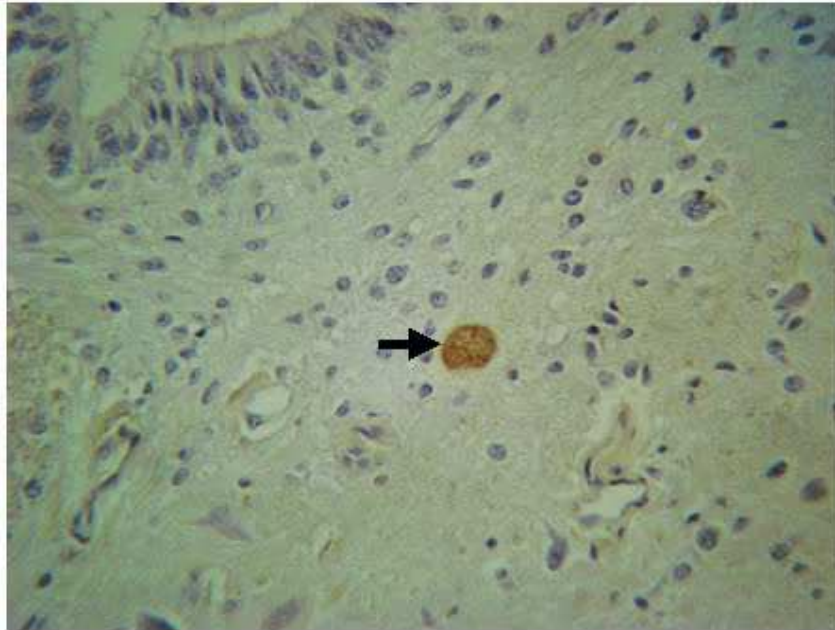
Um teste sorológico positivo indica exposição dos animais ao *Neospora*, não significando que os mesmos estejam doentes. Se uma vaca é positiva não significa que um aborto foi induzido por *N. caninum* com base nos dados do exame sorológico. Para confirmar se o aborto foi causado por *N. caninum*, o parasito deve ser encontrado nos tecidos fetais (ANDREOTTI et al., 2003).

2.6.3.2 Método Imunohistoquímica

As técnicas de imunohistoquímica (IHQ) permitem localizar e identificar o parasito nos cortes de tecido, utilizando soro policlonal ou anticorpo monoclonal Anti-*N. caninum*. Os tecidos que apresentam lesões compatíveis com *Neospora* nos exames histopatológicos convencionais, são analisados através da IHQ (Figura 8), baseada no uso do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase, com a finalidade de confirmar a presença de restos de antígeno, taquizoítos ou cistos com bradizoítos. (SILVA, 2004).

O estado de autólise dos fetos mumificados diminui a eficiência do diagnóstico. Este método deve ser minucioso, e é necessária a coloração de vários cortes histológicos do sistema nervoso central, para encontrar alguns parasitos.

Figura 8 - Cisto tecidual de neosporose (Imunohistoquímica)



Fonte: <http://sites.google.com/site/parasitovet/g%C3%AAneroneospora>

2.6.4 Diagnóstico Diferencial

A confirmação de infecção por *N. caninum* é necessária pelos métodos imunohistoquímico ou por PCR, para diferenciar de *Sarcocystis* sp. e de *T. gondii*, que podem causar lesões similares em fetos (Quadro 4). Nos casos de aborto e morte perinatal, além da neosporose, as doenças como brucelose, campilobacteriose, tricomoníase, leptospirose, IBR, BVD e clamidiose devem ser pesquisadas (ANDREOTTI et al., 2003).

Os exames histopatológico, imunohistoquímico e o método da PCR são os mais utilizados para o diagnóstico de aborto bovino por *N. caninum*. A associação dessas técnicas de diagnóstico com informações referentes ao histórico do rebanho e sorologia da mãe aumenta a probabilidade de detectar a infecção por *N. caninum* nos fetos bovinos (ANDREOTTI et al., 2003).

Quadro 4 - Diagnóstico diferencial de neosporose em cães

Etiologias
Trauma
Doença do disco intervertebral
Toxoplasmose
Outras doenças infecciosas, como raiva e cinomose
Neuropatias congênitas/hereditárias
Meningoencefalopatia granulomatosa (MEG) e outras doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC).
Doenças tromboembólicas
Neoplasias
Envenenamentos/botulismo
Vários tipos de miopatias ou miosites, incluindo miopatias metabólicas e distrofias musculares
Outras causas de miocardites, pneumonia
Outras causas de epilepsia

Fonte: Barber (1998).

2.7 TRATAMENTO

Não existem ainda medicamentos anti-neospora efetivos para o tratamento em bovinos. Várias drogas, como decoquinato, depudecin, toltrazulril, ponazuril, artemisinina e os extratos de ervas têm sido utilizados *in vitro* (cultivo celular) ou *in vivo* (camundongos), porém, em bovinos não há ainda a comprovação da eficiência e de sua aplicação a campo. O tratamento químico apresenta algumas limitações, como o desenvolvimento de resistência do parasito às drogas, os riscos para a saúde humana no consumo de carne ou de leite com resíduos químicos e a possibilidade de contaminação ambiental. O tratamento por quatro semanas com trimetoprim + sulfadiazina (15 mg/kg 2 x dia) e pirimetamina (1 mg/kg 1 x dia) tem sido utilizado em cães com sintomatologia nervosa, porém os resultados são inconsistentes (ANDREOTTI et al., 2003). O tratamento de bovinos parece ser inviável economicamente em função que só pode ser usado como medida preventiva, e deve ser utilizado por um período de tempo longo, o que poderia acarretar problemas residuais no leite e na carne dos animais, tornando-os impróprios para o consumo. Não se tem ainda um quimioterápico eficiente para o tratamento de neosporose em bovinos que tenha sido demonstrado ser seguro e

eficaz, sendo necessário maiores estudos nesta área (DUBEY; SCHARES, 2011).

2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE

Para o controle da neosporose é fundamental o conhecimento do ciclo de vida do parasito, o uso de técnicas diagnósticas eficientes para a identificação de animais infectados e o emprego de vacinas eficientes para a prevenção de abortos nos animais ou bloqueio da eliminação de oocistos pelos hospedeiros definitivos (GONDIM et al., 2005; DUBEY et al., 2007).

Não existem ainda métodos efetivos para o controle da neosporose bovina. As práticas de manejo do rebanho são utilizadas para tentar eliminar ou reduzir a infecção e os prejuízos causados por *N. caninum* (ANDREOTTI et al., 2003).

A neosporose se apresenta como causa de aborto e seu controle deve objetivar a redução da prevalência da infecção nas explorações com surtos de abortos, para prevenir sua propagação aos demais suscetíveis evitando tanto a transmissão horizontal quanto a vertical. As medidas de prevenção e controle da neosporose muitas vezes podem tornar-se economicamente inviável ou pouco práticas. As medidas incluem remover fetos abortados, placentas e bezerros mortos no pasto, minimizar a contaminação fecal de água e alimentos pelas fezes de cães e outros canídeos com oocistos, evitar a introdução de bovinos infectados no rebanho e descarte dos infectados, coibir o contato de cães com as instalações, como depósitos e currais, são medidas preventivas (INNES et al., 2002; DUBEY, 2003). Outra prática recomendável é evitar o fornecimento de carne crua aos cães porque, se ela estiver contaminada com o parasito, além de sofrer a infecção, o animal poderá se transformar um hospedeiro definitivo (ANDREOTTI et al., 2003).

Larson et al. (2004) ao avaliarem um modelo de estratégias de controle para um período estimado de cinco anos em um rebanho de bovinos de corte endemicamente infectado, concluíram que medidas como o descarte de fêmeas que abortaram e a venda de fêmeas soropositivas, seguida pela reposição de fêmeas soronegativas, não foram economicamente viáveis. Enquanto que a realização do teste para *N. caninum* em animais que serão introduzidos no rebanho, seguido da exclusão das fêmeas provenientes de mães soropositivas como potenciais repositoras do rebanho, parece ser uma estratégia de controle com melhor retorno econômico.

Garantir um bom estado nutricional das vacas prenhes vai ajudar a reduzir os riscos de aborto entre os animais infectados por esse parasito. Em rebanhos controlados deve-se introduzir somente animais soronegativos evitando prejuízos econômicos na produção. Os animais soropositivos e os seus descendentes não devem ser mantidos na reprodução, devem ser descartados quando o número de animais for baixo, para evitar a transmissão vertical do parasito no rebanho. A utilização de animais soronegativos para reposição do rebanho também é uma medida importante para controlar a neosporose. Outra medida indicada para evitar a transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos é a transferência de embriões em vacas soronegativas. Dependendo da prevalência da doença no rebanho, essa prática pode ser economicamente inviável (ANDREOTTI et al., 2003).

Fármacos que previnem a transmissão do parasito da mãe para o feto bovino são ainda desconhecidos, entretanto pesquisas estão sendo realizadas (DUBEY, 2003). Porém grandes avanços foram obtidos na identificação e processamento de antígenos de *N. caninum*. Em alguns estudos, camundongos vacinados e desafiados com taquizoítos do parasito, tiveram uma resposta protetora significativa contra infecção transplacentária e abortos. Entretanto, as vacinas até então desenvolvidas para neosporose, não conferiram imunidade eficiente contra abortos em bovinos (ROMERO et al., 2004).

Estudos sobre desenvolvimento de vacinas estão sendo realizados por laboratórios e centro de pesquisa, e atualmente no Brasil já existe vacina comercial disponível no mercado. Bovilis Neoguard é uma vacina inativada de *N. caninum*, foi avaliada em um estudo de campo que demonstrou ser eficaz na redução do índice geral de abortos. A vacina Bovilis Neoguard desenvolvida pela Intervet, contém taquizoítos inativados de *N. caninum* com o adjuvante SPUR. A seleção do adjuvante teve como base a capacidade do SPUR estimular não apenas a resposta humoral, mas também uma resposta mediada por células. Foi demonstrado que também induz reação mínima no local da injeção, tornando-se um adjuvante seguro e eficaz (BIELSA et al., 2004). O tratamento com várias sulfonamidas com inibidores de dihidrofolato redutase e timidilato sintetase foram eficientes contra neosporose (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Um trabalho realizado na Costa Rica, empregando o uso de vacinas com antígenos mortos de *N. caninum* demonstraram redução de 46,2% das taxas de aborto em rebanhos com alta incidência de abortamento (ROMERO et al., 2004).

Com relação à segurança da vacina, não foram reportados efeitos diversos no local de aplicação e nem outros efeitos colaterais como redução da produção de leite ou alterações no comportamento das vacas (BIELSA et al., 2004).

REFERÊNCIAS

- ABBIT, B. et al. Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 3, p. 444-8, 1993.
- AGERHOLM, J. S.; BARR, B. C. Bovine abortions associated with *Neospora* in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 35, n. 4, p. 461-4, 1994.
- AGUIAR, D. M. **Prevalência de anticorpos anti-Neospora caninum, anti-Brucella abortus e anti-Lepstospira spp em bovinos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia**: estudo de possíveis fatores de risco. 2004. 118 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ALMERÍA, S. et al. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 287-94, 2002.
- ANDERSON, M. L. et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 207, p. 1206-10, 1995.
- ANDERSON, M. L. et al. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, p. 241-4, 1991.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-31, 2000.
- ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 1169-72, 1997.
- ANDREOTTI, R. et al. Clonagem e expressão da porção C-terminal do antígeno de superfície NC-43 de *Neospora caninum* e sua identidade com anticorpos de bovinos no estado de Mato Grosso do Sul. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE NEOSPOORA CANINUM, 1., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2005, p. 21.
- ANDREOTTI, R. et al. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 2003. p. 51. v.1.
- ANDREOTTI, R. et al. Sorologia anti-*Neospora caninum* em gado de corte e em cães no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. 1 CD-ROM.
- ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R.; GOMES, A. Diagnóstico sorológico de um rebanho bovino de corte de Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio

Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 226.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2013.

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

BARBER, J. S. *Canine neosporosis*. **Waltham Focus**, v. 8, n. 1, p. 25-9, 1998.

BARR, B. C. et al. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 1, p. 113-7, 1993.

BARR, B. C. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v. 28, p. 110-6, 1991.

BARTELS, C. J.; WOUUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*- associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, p. 247-57, 1999.

BASSO, W. et al. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 906-907, 2001.

BELO, M. A. A. et al. Presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos com histórico de abortos não diagnosticados etiologicamente. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador-BA. **Anais...** Salvador, 1999. p. 228. (Resumo).

BENETTI, A. H. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 29-33, 2009.

BIELSA, J. M. et al. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 34-7, 2004

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-4, 1984.

BRAUTIGAM, F. E.; HIETALA, S. K.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996. p. 284.

BUXTON, D., MALEY, S. W., WRIGHT, S. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p. 267-79, 1998.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of

neosporosis. **Trends Parasitology**, v. 18, p. 546-52, 2002.

CAETANO-DA-SILVA, A. et al. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329-36, 2004.

CAMPERO, C. M. et al. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. **Veterinary Record**, v. 143, n. 8, p.228-9, 1998.

CAÑÓN-FRANCO, W. A. et al. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids: *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 275-7, 2004.

CONRAD, P. A. et al. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. **Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 239-49, 1993.

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

COSTA, G. H. N. et al. Freqüência de anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Revista Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 61-6, 2001.

COSTA, K. S. et al. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 157-9, 2008.

DE MAREZ, T. et al. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1647-57, 1999.

DIJKAŠTRA, T. et al. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 747-52, 2001.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-85, 1988.

DUBEY, J. P. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, p. 1160-3, 1999.

DUBEY, J. P.; LEATHERS, C. W.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum* like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 146-8, 1989.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of

neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323-67, 2007.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90-108, 2011.

ELLIS, J. T. et al. A. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1589-96, 1999.

FERREIRA, I. S. **Neosporose bovina**. 2000. 33 f. Monografia (Graduação) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

FIGLIUOLO, L. P. C. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 161-6, 2004.

FURUTA, P. I. et al. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v. 134, p. 1931-9, 2007.

GENNARI, S. M. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE NEOSPORA CANINUM, 1., 2005. São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, São Paulo, 2005.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 23-8, 2004.

GIBNEY, E.H. et al. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 579-88, 2008.

GIRALDI, J. H.; BRACARENSE, A. P.; VIDOTTO, O. Neosporose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 34, p. 50-56, 2001.

GONDIM L. F. P. et al. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 6, p. 1361-5, 2004b.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-61, 2004a.

GONDIM, L. F. P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999a.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 1159-63, 2002.

GONZALES, L. et al. A Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, v. 144, n. 6, p. 145-50, 1999.

GOTTSTEIN, B. et al. Molecular and immunodiagnosis of bovine neosporosis in Switzerland. **Schweizer Archive für Tierheilkunde**, v. 141, n. 2, p. 59-68, 1999.

GUIMARÃES JUNIOR, J. S. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

HASEGAWA, M. Y. **Soroprevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos de corte e em cães rurais da região de Avaré – SP**. 2000. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2000.

HOBSON, J. C. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 177-88, 2005.

HOLMDAHL, O. J. M.; BJÖRKMAN, D.; UGGLA, A. A. Case of *Neospora* associated bovine abortion in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 36, p. 279-81, 1995.

HORNOK, S. et al. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in bovine post abortion blood samples from Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 46, n. 4, p. 431-36, 1998.

HUONG, L. T. T. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 53-57, 1998.

INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497-04, 2002.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO (INDEA-MT). **Bovinos existentes no estado de Mato Grosso durante etapa de vacinação contra febre aftosa de novembro de 2012**. 2013. Disponível em: <http://www.indea.mt.gov.br/arquivos/A_2e76cdcf61d8afb89fb011a74976613bRCVF A-11-2012-MUNICIPIOS.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2013.

JESUS, E. E. V. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas. Estado da Bahia – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 5-10, 2006.

KING, J. S. et al. Extensive production of *Neospora caninum* tissue cysts in a carnivorous marsupial succumbing to experimental neosporosis. **Veterinary Research**, v. 42, p. 3-15, 2011.

LARSON, R. L.; HARDIN, D. K.; PIERCE, V. L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 1597-604, 2004.

LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinarian Research**, v. 50, p. 1981-93, 1989.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 327-33, 1999.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras e bezerros no Estado do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 6, p. 37-41, 2001b.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1493-4, 2001a.

MARQUES, F. A. C. et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitology Research**, v. 108. n. 4, p. 1015-9, 2011.

MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 983-991, 1998.

McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-8, 1998.

McALLISTER, M. M. et al. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 6, p. 647-55, 1996.

McNAMEE, P. T.; JEFFREY, M. *Neospora*-associated bovine abortion in northern Ireland. **Veterinary Record**, v. 134, p. 48-52, 1994.

MELLO, R. C. et al. Levantamento epidemiológico de *Neospora caninum* em bovinos de assentamentos rurais em corumbá, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 311-16, 2008.

MELO, C. B. **Neospora caninum em Minas Gerais**: aspectos epidemiológicos. 2001. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

MELO, C. B.; LEITE, R. C. *Neospora caninum* em Minas Gerais: dados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador-BA. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 225.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; LEITE, R. C. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Revista CFMV**, n. 35, p. 32-42, 2005.

MELO, D. P. G. et al. Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 105-09, 2006.

MOORE, D. P. et al. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 303-16, 2002.

MOORE, D. P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 87-97, 2005.

- MUNHOZ, A. D. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas, no rebanho leiteiro do município de Resende, estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002a. CD-ROM
- MUNHOZ, A. D. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas, no rebanho leiteiro do município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002b. CD-ROM.
- MUNHOZ, A. D. et al. *Neospora caninum* seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 29-32, 2009.
- NETA, A. V. C.; JÚNIOR, J. R. S. T. **Neosporose**: emergente causa de perdas reprodutivas em bovinos de corte. Campinas: BeefPoint, 2006. Disponível em: <<http://beefpoint.com.br/?actA=7&arealD=60&secaoID=183¬icialD=30030>>. Acesso em: 19 jun. 2011.
- OGAWA, L. **Estudo soroepidemiológico de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de pecuária leiteira da região norte do estado do Paraná.** 2000. 54 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.
- ORTEGA-MORA, L. M. et al. Detection of *Neospora caninum* in sêmen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-08, 2003.
- OSHIRO, L. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 133-38, 2007.
- O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **Veterinary Record**, v. 121, p. 563-76, 1987.
- OTTER, A. et al. Survey of the incidence of *N. caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 136, n. 24, p. 602- 06, 1995.
- PARÉ, J. et al. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 213, p.1595-8, 1998.
- PARISH, S. M. et al. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, p. 1599-600, 1987.
- PITUCO, E. M. et al. Sorodiagnóstico de Neosporose bovina no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, p. 83, 2001. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo. Resumo 113. 1CD-ROM.

RAGOZO, A. M. A. R. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüino**. São Paulo: Varela, 2003. v. 2.

ROMANELLI, R. P.; JUNIOR, G. S. J. Neosporose em animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 665-78, 2006.

ROMERO, J. J.; PEREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 149-59, 2004.

SÁNCHEZ, G. F. et al. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 142-45, 2003.

SANTOS, S. L. et al. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia sp.*, and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**, v. 106, p. 457-61, 2010.

SARTOR, I. F. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p.413-18, 2005.

SARTOR, I. F. et al. Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros do município de Avaré, SP. Resultados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999. Salvador-BA. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999, p. 225.

SHIVAPRASAD, H. L.; ELY, R.; DUBEY, J. P. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 145-48, 1989.

SILVA, A.C. Diagnóstico da Neosporose Bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 29-32, 2004,

SILVA, M. I. S. et al. Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos leiteiros do município de Gravatá. Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. CD-ROM.

STOBBE, N. S.; CÔRTEZ, J. A. Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador-BA. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 226.

TEIXEIRA, W. C. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: *Sarcocystidae*) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 9,

p. 729-34, 2010.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal Veerinary Diagostic Invesigation**, v. 1, p. 205-09, 1989.

THORNTON, R. N.; GAJADHAR, A.; EVANS, J. Neospora abortion epidemic in a dairy herd. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 42, p. 190-01, 1994.

THURMOND, M.; HIETALA, S. K.; BLANCHARD, P. C. Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 90-94, 1999.

VITALIANO, S. N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neosporosis caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 253-60, 2004.

WALKER, B. Neospora caninum infection in cattle. **Agnote**, v. 1, p. 1-3, 2004.

WOODS, L. W. et al. Sistemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 508-10, 1994.

WOUDA, W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1677-82, 1999.

XIA, H. Y. et al. Seroprevalence of Neospora caninum Infection in Dairy Cattle of Southern China. **The Journal of Parasitology**, v. 97, p. 172-83, 2011.

YAI, L. E. O. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 89, p. 870-81, 2003.

YAMANE, I. et al. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **American Journal of Veterinarian Research**, v. 54, n. 10, p. 1579-84, 1993.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a soroprevalência de neosporose em fêmeas e fetos da espécie bovina e a transmissão vertical de *N. caninum* nesses animais, oriundos do município de Nossa Senhora do Livramento, abatidos em uma unidade frigorífica do município de Várzea Grande – MT.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* nas amostras de soro das fêmeas e fetos, na linha de abate no frigorífico localizado no município de Várzea Grande-MT, por meio da técnica de imunofluorescência indireta.

Avaliar a transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos (*Bos indicus*) submetidos a abate, oriundos do município de Nossa Senhora do Livramento – MT.

4 ARTIGO

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*N. CANINUM* EM FÊMEAS E FETOS DA ESPÉCIE BOVINA DO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO LIVRAMENTO – MT

Survey of anti-N. caninum in females and bovine fetuses in the municipality of Nossa Senhora do Livramento -MT

Robson de Souza Rodrigues¹

RESUMO

A Neosporose, doença emergente que tem como agente etiológico o *Neospora caninum*, pode causar abortos e morte neonatal em bovinos, acarretando perdas econômicas em todo o mundo. No Brasil, são frequentes casos de abortos em animais domésticos sem um diagnóstico definitivo. Existem poucas informações sobre a real situação epidemiológica dessa doença no Estado de Mato Grosso, que é detentor do maior rebanho bovino do País. Com o objetivo de avaliar a soroprevalência de neosporose em fêmeas e fetos da espécie bovina e a transmissão vertical de *N. caninum* nesses animais, oriundos do município de Nossa Senhora do Livramento, abatidos em uma unidade frigorífica do município de Várzea Grande – MT. Foram coletadas amostras de sangue de 489 fêmeas na linha de abate e de 128 fetos acima de três meses de gestação, obtidos durante a evisceração das referidas fêmeas. A pesquisa de anticorpos anti *N. caninum* nas fêmeas e fetos bovinos foi determinada pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Obteve-se neste estudo 2,45% (12) de fêmeas soropositivas e 3,91% (5) de fetos soropositivos para *N. caninum*. Esse estudo demonstra a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em fetos, confirmando a participação do parasito na transmissão vertical em bovinos do município de Nossa Senhora do Livramento (MT), podendo ser uma das causas de aborto em fêmeas bovinas do referido município.

Palavras-chave: Bovinos de corte, imunofluorescência, neosporose, frigorífico, transmissão vertical.

¹ Mestrando do Programa de Pós-graduação em biociência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC

ABSTRACT

Neosporosis, is an emerging disease which the etiologic agent is the *Neospora caninum*, it can cause miscarriages and stillbirth in cattle, leading to economic losses worldwide. In Brazil, there are frequent cases of abortions in domestic animals without a definite diagnosis. There is little information about the actual situation epidemiology of this disease in the State of Mato Grosso, state that holds the largest cattle herd in the country. With the objective of evaluating the seroprevalence of neosporosis in female and fetuses bovine and vertical transmission of *N. caninum* in these animals, of the municipality of Nossa Senhora do Livramento – MT, from cattle slaughtered in a local slaughterhouse in the municipality of Varzea Grande- MT, we collected blood samples of 489 females on the slaughter line and 128 fetuses above three months of gestation, obtained during evisceration of those females. The detection of anti *N. caninum* in dams and fetuses was determined by the technique of Indirect Immunofluorescence (IFAT). We obtained in this study 2.45% (12) of seropositive and 3.91% (5) seropositive to *N. caninum*. This study demonstrates the presence of anti-*N. caninum* in fetuses, confirming the participation of the parasite in vertical transmission in cattle in the municipality of Nossa Senhora do Livramento (MT) and it can be a cause of females abortion from this municipality.

Keywords: Beef cattle, immunofluorescence, neosporosis, slaughterhouse, vertical transmission.

INTRODUÇÃO

A Neosporose é uma doença emergente que tem como agente etiológico o *Neospora caninum*, que pode causar abortos e morte neonatal em bovinos, acarretando perdas econômicas em todo o mundo (DUBEY e SCHARES, 2011).

No Brasil, são frequentes os casos de aborto em animais domésticos sem um diagnóstico definitivo, e a neosporose ainda não foi incluída como rotina nos exames laboratoriais. Como principais razões destacam-se a falta de conhecimento do agente pelos pecuaristas/produtores e da sua prevalência nos rebanhos brasileiros, prejuízos econômicos acarretados pela enfermidade, custo elevado dos kits diagnósticos e a difícil obtenção e manutenção da cepa do protozoário (ANDREOTTI

et al., 2003). Fatores estes que persistem até os dias atuais, sendo entrave para o diagnóstico rotineiro desta enfermidade pelos profissionais que atuam na área.

A neosporose pode ser observada nas diversas espécies de animais domésticos, sendo sua ocorrência relatada pela presença do parasito ou dos anticorpos Anti-*N. caninum* em bovinos, caprinos, ovinos e caninos. As infecções clínicas e subclínicas de *N. caninum* em cães são importantes epidemiologicamente, pois o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal hospedeiro definitivo podendo eliminar oocistos no meio ambiente, tornando-se um fator de risco para a ocorrência de abortos associados a *N. caninum* em bovinos (PARÉ et al., 1998). Pesquisas realizadas demonstraram que a presença e o número de cães nas propriedades rurais podem funcionar como fatores de risco para a infecção e a ocorrência de abortos em bovinos, indicando uma associação entre a infecção em ambas as espécies (SÁNCHEZ et al., 2003).

Várias técnicas podem ser utilizadas para revelar a presença do parasito, como exames histopatológicos e imunohistoquímicos, amplificação dos genes (PCR) e o isolamento dos parasitos mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório. A alternativa é o diagnóstico sorológico, com a pesquisa de anticorpos contra *N. caninum* (ANDREOTTI et al., 2003).

Ragozo et al. (2003) realizaram levantamento sorológico em seis Estados brasileiros, obtendo-se soropositividade média de 23,6% nos rebanhos bovinos, com aumento dos índices nos bovinos com idade superior a 24 meses. Foi observada também maior ocorrência nos bovinos de leite (26,2%) quando comparados com os de corte (19,1%).

A transmissão vertical (transplacentária) é a principal forma de disseminação de *N. caninum* em rebanhos bovinos (DUBEY, 2003). As maiores prevalências de soropositivos para *Neospora* são encontradas em bovinos de leite (ANTONIASSI et al., 2007). No Brasil, foi detectada prevalência de 14,1% em bovinos leiteiros da Bahia (GONDIM et al., 1999).

Estudos têm sido realizados com diversas espécies de animais susceptíveis, visando melhor elucidação da neosporose, levando em consideração o agente, o hospedeiro e o ambiente (GUIMARAES e ROMANELLI, 2006). Vale ressaltar que as pesquisas realizadas para determinar a prevalência sorológica de *N. caninum* mostram diferenças consideráveis entre países, dentro dos países, entre regiões, e entre bovinos de corte e de leite. Portanto, deve-se ter cuidado ao avaliar estes

resultados, em função de diferenças nas técnicas sorológicas, desenho do estudo e tamanho da amostra utilizada (DUBEY et al., 2007).

Considerando que o Estado de Mato Grosso tem como base econômica o seu potencial agropecuário, sendo detentor do maior rebanho bovino do País, com 28.651.256 cabeças (INSTITUTO..., 2013), bem como, existem poucas informações sobre a real situação epidemiológica dessa doença no Estado (BENETTI et al., 2009), este trabalho tem como objetivos avaliar a soroprevalência de neosporose em fêmeas bovinas, oriundas do município de Nossa Senhora do Livramento, bem como, verificar a transmissão vertical em fetos obtidos destas fêmeas, abatidas em uma unidade frigorífica localizada no município de Várzea Grande – MT.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em uma indústria frigorífica do município de Várzea Grande – MT, pertencente à região metropolitana de Cuiabá, no estado de Mato Grosso, sob a égide do Serviço de Inspeção Sanitária Estadual (SISE 16) do Instituto de Defesa Agropecuária do Estado do Mato Grosso (INDEA-MT). O trabalho foi desenvolvido com fêmeas bovinas abatidas na referida indústria frigorífica e fetos acima de três meses de gestação obtidos das fêmeas abatidas, oriundas de propriedades rurais do município de Nossa Senhora do Livramento – MT. Esse município possuía um rebanho de, aproximadamente, 61.664 fêmeas bovinas (0,66% do total de fêmeas do Estado de Mato Grosso). Deste total, em média 3.040 fêmeas são abatidas ao ano (MATO GROSSO, 2011a), sendo que, 1.720 (50%) foram abatidas em 2010/2011 no SISE 16 (MATO GROSSO, 2011b).

O tamanho da amostra coletada foi determinado pelo programa Epiinfo V. 3.5.2 utilizando-se a fórmula: $n = Z^2 [p(1-p) N] / d^2 (N-1) + Z^2 [p (1-p)]$, onde **n** é o tamanho da amostra; **N** é o tamanho da população; **Z** é o valor utilizado para o intervalo de confiança de 99%; **p** é a prevalência e **d** é o erro absoluto (THURSFIELD, 2007). O cálculo foi realizado adotando o valor de 50% para a prevalência esperada, por não se conhecer a prevalência de neosporose em bovinos no Estado de Mato Grosso, aceitando erro de 5% da prevalência a ser determinada no estudo. A quantidade de amostras sorológicas colhidas ao mês foi calculada considerando a proporção da média de fêmeas abatidas mensalmente no período de Abril a outubro de 2010 e 2011, obtendo-se total de 1533 e 1906 fêmeas abatidas

nos respectivos períodos de 2010 e 2011 (MATO GROSSO, 2011b). Obtendo-se amostra mínima a ser colhida de 479 animais, sendo a escolha das propriedades e dos animais de acordo com o encontrado na linha de abate do SISE 16.

Com base nas informações acima, no período de maio a setembro/2012 foram colhidos, na linha de abate da referida indústria frigorífica, durante a sangria, em torno de 10 mL de sangue de 489 fêmeas, em tubo sem anticoagulante. Também foram colhidas amostras, em torno de 5 mL de sangue, obtidos por punção cardíaca, de 128 fetos acima de três meses de gestação, obtidos durante a evisceração das referidas fêmeas, sendo todos identificados pela numeração dos lotes abatidos e respectivas datas de abate. A idade dos fetos foi estimada segundo seu comprimento (cm), mensurado a partir da articulação Atlanto Occipital até a primeira vértebra coccigiana (acima de 13 cm), de acordo com Grunert e Birgel (1989).

As amostras sanguíneas coletadas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi colocado em tubetes plásticos identificados e armazenados em freezer à temperatura de -18°C , para posterior análise no Laboratório de Imunodiagnóstico da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC.

As amostras dos soros das fêmeas e dos fetos bovinos foram examinadas por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, segundo Conrad et al. (1993). Foram utilizados taquizoítas de *N. caninum* cultivados em células Vero e fixados em lâminas de vidro. Inicialmente foi realizada a triagem dos soros bovinos e dos fetos na diluição 1:100 e 1:25, respectivamente. As reações com título igual ou maior que 100 e 25, respectivamente foram consideradas positivas (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os soros foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (tampão PBS pH 7,2). Dez microlitros do soro foram adicionados aos poços das lâminas contendo o antígeno. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida as mesmas foram lavadas duas vezes em tampão PBS, por 10 minutos, e colocadas para secar por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados dez microlitros do conjugado anti IgG bovino (Sigma Chemical, F7887), marcado com isotiocianato de fluoresceína diluído, de acordo com as informações do fabricante, e em Azul de Evans a 0,01%, sendo as lâminas novamente incubadas, nas mesmas condições

antes descritas. A seguir, as lâminas foram lavadas duas vezes em tampão PBS, por 10 minutos cada (remoção do excesso de sais), e colocadas para secar em temperatura ambiente durante 20 minutos. Após a secagem foi adicionada glicerina tamponada e as lâminas foram recobertas com lamínulas. Para cada lâmina confeccionada havia um poço destinado a um controle negativo e outro a um controle positivo, onde a reação foi processada com soros de animal negativo e positivo, previamente analisados.

A observação das lâminas foi realizada em microscópio (Axis A1 Zeiss) equipado para fluorescência (sistema de epi-iluminação) com objetiva de 40x. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em toda a periferia dos parasitos, ainda que em pequena intensidade. Nas reações negativas, os parasitos presentes na lâmina não apresentavam fluorescência, ou esta ficava localizada apenas em uma das extremidades dos mesmos, sendo caracterizada como “coloração polar” ou “reação apical”.

Os resultados obtidos nas análises laboratoriais foram submetidos ao Teste Qui-quadrado (χ^2) considerando como nível de significância para $\alpha= 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se neste estudo prevalência de 2,45% (12) para fêmeas gestantes soropositivas e de 3,91% (5) para fetos soropositivos para *N. caninum*. A predominância dos bovinos abatidos era da raça Nelore e respectivos mestiços, destinados à produção de carne. Esta prevalência foi bem inferior a obtida por Benetti et al. (2009) que registraram 53,5% de soropositivos para *N. caninum* em bovinos de leite do município de Araputanga - MT. Segundo Moore et al. (2002) a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* é maior em vacas leiteiras em relação às de corte. Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007) relatam que diferentes prevalências obtidas, ocorrem em função das diferentes técnicas sorológicas de diagnóstico empregadas, ao desenho do estudo e ao tamanho da amostra utilizada.

Os resultados da titulação da sorologia das fêmeas e fetos positivos apresentaram as seguintes titulações: 11 fêmeas com 1:100 e uma com 1:200. Já os fetos registraram: dois com titulação 1:25, dois com 1:200 e um com 1:400.

Ao avaliar a Tabela 1, observa-se que em todas as datas de coleta onde foram encontrados fetos soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum* sempre foram

registradas a presença de fêmeas também soropositivas. Gibney et al. (2008) relataram que a neosporose bovina é uma doença relacionada a placenta e ao feto, e que tem como causa uma parasitemia materna. Dubey e Schares (2011) ressaltaram que a transmissão vertical e a ingestão oocistos nas fezes de cães é mais importante para os bovinos do que para os cães e pode se afirmar que a infecção dos fetos soropositivos obtidos neste estudo, ocorreu por transmissão vertical (transplacentária). Vale ressaltar que Canada et al. (2006) observaram que vacas inseminadas com sêmen contaminado com taquizoitos de *N. caninum* não adquiriram a infecção e que a transmissão venérea é possível, mas improvável (Serrano-Martinez et al., 2007).

Bartels et al. (2007) realizaram estudo em rebanhos leiteiros da raça Holandesa e obtiveram 61,8% de transmissão vertical, podendo esta taxa variar entre rebanhos conforme citado por Dubey e Schares (2011) em revisão realizada sobre neosporose em animais.

Tabela 1 - Distribuição das coletas de sangue, número de fêmeas e fetos coletados e de soropositivos para *Neospora caninum* obtidos durante o abate realizado no período de maio a setembro de 2012, no frigorífico de Varzea Grande - MT (SISE 16)

Data Coleta	N fêmeas coletadas	N fêmeas positivas	N de fetos coletados	N fetos positivos
14/05	42	0	2	0
16/05	29	2	2	0
24/05	40	1	11	0
06/06	48	2	17	1
14/06	14	1	4	0
15/06	32	0	5	0
13/07	97	0	29	0
17/07	42	1	8	1
24/07	44	2	14	2
27/07	17	1	6	0
28/08	20	1	7	0
16/09	12	0	2	0
17/09	52	1	21	1
Total	489	12	128	5

Neste estudo, a validade interna da amostra foi testada aplicando-se o Teste Qui quadrado, confirmando para um nível de significância de 5% de probabilidade, que as 489 fêmeas avaliadas e obtendo-se 12 positivas, foram consistentes para afirmar que a amostra utilizada foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$) para prever a prevalência de neosporose na população bovina em estudo (Tabela 2). Assim, pode se afirmar que o rebanho de fêmeas bovinas do município de Nossa Senhora do Livramento (MT) apresentou 2,45% de animais soropositivos para

anticorpos anti-*N. caninum*, demonstrando que a neosporose está presente nos animais e pode ser uma das causas de aborto em fêmeas bovinas do referido município. Vale lembrar que é necessário considerar que a variabilidade de prevalência pode ser influenciada pela aptidão das fêmeas destinadas a produção de carne ou de leite.

Tabela 2 - Análise estatística da distribuição amostral das fêmeas abatidas no frigorífico de Varzea Grande - MT (SISE 16), no período de maio a setembro de 2012, com relação ao estudo realizado para identificar anticorpos anti-*N. caninum*

Amostra (N fêmeas)	Negativas	Positivas	Qui-quadrado	p*
489	477	12	442,178	0,000

Outros estudos devem ser realizados no estado de Mato Grosso para determinar a prevalência de neosporose em bovinos de leite e corte como causa de aborto ocorridos no rebanho e quantificar o real prejuízo acarretado por este protozoário no rebanho, visando sensibilizar os pecuaristas a adotarem medidas preventivas e evitar a contaminação dos animais, reduzindo assim as perdas econômicas ocorridas neste setor.

CONCLUSÃO

Comprovou-se a presença de fêmeas e fetos bovinos soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum*, demonstrando que a neosporose está presente no município de Nossa Senhora do Livramento (MT).

Esse estudo demonstrou a ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum* em fêmeas gestantes do município de Nossa Senhora do Livramento (MT).

REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R. et al. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003. v. 1. p. 51.

ANTONIASSI, N. A. B. et al. Diagnóstico das causas infecciosas de aborto em bovinos. **Biológico**, v. 69, p. 69-72, 2007.

BARTELS, C. J. M. et al. Quantification of vertical and horizontal transmission of

Neospora caninum infection in Dutch dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 83-92, 2007.

BENETTI, A. H. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 29-33, 2009.

CANADA, N. et al. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 109-14, 2006.

CONRAD, P. A. et al. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. **Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 239-49, 1993.

DUBEY, J. P. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323-67, 2007.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90-108, 2011.

GIBNEY, E. H. et al. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 579-88, 2008.

GONDIM, L. F. P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999a.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. **Obstetrícia veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 1989. 323 p.

GUIMARÃES JUNIOR, J. D. A. S.; ROMANELLI, P. R. Neosporose em Animais Domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 665-78, 2006.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO (INDEA-MT). **Bovinos existentes no estado de Mato Grosso durante etapa de vacinação contra febre aftosa de novembro de 2012**. 2013. Disponível em: <http://www.indea.mt.gov.br/arquivos/A_2e76cdcf61d8afb89fb011a74976613bRCVF A-11-2012-MUNICIPIOS.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2013.

MATO GROSSO. Secretaria de Assuntos Fundiários do Estado de Mato Grosso. **Banco digitalizado de informação da vacinação**. Cuiabá: INDEA, 2011a.

MATO GROSSO. Secretaria de Assuntos Fundiários do Estado de Mato Grosso. **Sistema informatizado de Animais: situação em 2011**. Cuiabá; INDEA, 2011b.

MOORE, D. P. et al. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 303-16, 2002.

PARÉ, J. et al. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 213, p.1595-8, 1998.

SÁNCHEZ, G. F. et al. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 142-5, 2003.

SERRANO-MARTÍNEZ, E. et al. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v. 67, p. 1175-84, 2007.

THURSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3. Ed. Iowa – USA: Wiley-Blackwell, 2007, 607 p.